

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

CARACTÉRISATION DES RÉCEPTEURS AUX  
PROSTAGLANDINES CHEZ LES CHONDROCYTES  
BOVINS EN CULTURE

par

CAROLINE PATRY

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc.)

Novembre 1996



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21811-2



*Je dédie ce mémoire  
à mes parents  
Jean-Paul et Francine,  
à mon mari Stéphane  
et ma fille Josiane*

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES PRODUITS UTILISÉS .....</b>	<b>xii</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>xiv</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Cartilage .....</b>	<b>2</b>
1.1 Les chondrocytes .....	2
1.2 La matrice extracellulaire .....	3
<b>2. La physiologie et la physiopathologie du cartilage articulaire .....</b>	<b>4</b>
2.1 Enzymes impliquées dans le remodelage et destruction du cartilage .....	5
2.2 Inhibiteurs des protéases .....	6
2.3 Éléments impliqués dans le contrôle du métabolisme cartilagineux.....	7
<b>3. Les prostaglandines .....</b>	<b>8</b>
3.1 Synthèse .....	9
3.2 Effets Biologiques.....	10

3.3 Récepteurs des prostaglandines .....	13
3.3.1 Historique.....	13
3.3.2 Sous-types de récepteurs à la PGE <sub>2</sub> .....	14
3.3.3 Seconds messagers.....	17
3.3.4 Distribution tissulaire.....	18
3.3.5 Biologie Moléculaire .....	19
<b>4. Problématique .....</b>	<b>22</b>
<b>BUT DE L'ÉTUDE .....</b>	<b>24</b>
<b>MÉTHODES .....</b>	<b>25</b>
<b>1. Culture cellulaire: .....</b>	<b>25</b>
<b>2. Production d'AMPc.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Inhibition d'AMPc .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Production d'inositol trisphosphate .....</b>	<b>27</b>
<b>5. Détermination du calcium intracellulaire .....</b>	<b>28</b>
<b>6. Dosage des glycosaminoglycans.....</b>	<b>29</b>
<b>7. Dosage des métalloprotéases .....</b>	<b>29</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>31</b>
<b>1. Production de Prostaglandines .....</b>	<b>31</b>
<b>2. Récepteur de prostaglandines.....</b>	<b>31</b>
2.1 Sous-type EP <sub>2</sub> .....	35
2.2 Sous-type EP <sub>3</sub> .....	35
2.3 Sous-type EP <sub>1</sub> .....	40
2.4 Sous-type EP <sub>4</sub> .....	40

3. Effet des PGE <sub>2</sub> sur les Glycosaminoglycans .....	43
4. Effet des PGE <sub>2</sub> sur la production des métalloprotéases .....	43
DISCUSSION .....	48
CONCLUSION.....	56
REMERCIEMENTS .....	57
BIBLIOGRAPHIE.....	59

## LISTE DES PUBLICATIONS

PATRY, C., LORA, M., DE BRUM-FERNANDES, A.J., Characterization of the AMP-cyclase-coupled PGE<sub>2</sub> receptor in bovine chondrocytes as the EP2 subtype.

Proceedings of the 9th International Conference on Prostaglandins and related compounds. Florence, 6-10 juin 1994, p.84

PATRY, C., MORISSET, S., DE BRUM-FERNANDES, A.J., Caractérisation d'un récepteur à la PGE<sub>2</sub> de sous-type EP2 couplé à l'AMP-cyclase chez les chondrocytes bovins. Club de recherches cliniques du Québec, Médecine-Science 10 (suppl 1): p. 43, 1994

PATRY, C., LORA, M., DE BRUM-FERNANDES, A.J., Characterization of the PGE<sub>2</sub> receptor subtype in bovine chondrocytes in culture. 58 th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, Arthritis & Rheumatism 37 (suppl 9) p. S285, Minneapolis, October 23-27 1994

DE BRUM-FERNANDES, A.J., MORISSET, S., BKAILY, G., PATRY, C., (1996)

Characterization of the PGE<sub>2</sub> receptor in subtype in bovine chondrocytes in culture.

Br. J. Pharmacol. **118**: 1597-1604

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1	PRODUCTION DE PROSTAGLANDINE $E_2$ PAR LES CHONDROCYTES BOVINS EN CULTURE.....	32
FIGURE 2	PRODUCTION D'AMPC INDUITE PAR $PGE_2$ , $PGD_2$ ET CARBAPROSTACYCLINE, CHEZ LES CHONDROCYTES BOVINS EN CULTURE.....	33
FIGURE 3	EFFET DE CARBAPROSTACYCLINE ET DE $PGE_2$ SUR LA PRODUCTION D'AMPC.....	34
FIGURE 4	PRODUCTION D'AMPC PAR LES AGONISTES À LA $PGE_2$ CHEZ LES CHONDROCYTES BOVINS EN CULTURE. ....	36
FIGURE 5	INHIBITION DE LA PRODUCTION D'AMPC INDUITE PAR $PGE_2$ APRÈS STIMULATION AVEC FORSKOLINE .....	37
FIGURE 6	EFFET DE LA TOXINE PERTUSSIS SUR LA PRODUCTION D'AMPC INDUITE PAR LA $PGE_2$ .....	39
FIGURE 7	PRODUCTION D' $IP_3$ INTRACELLULAIRE DÉTERMINÉE PAR CHROMATOGRAPHIE CHEZ LES CHONDROCYTES BOVINS EN CULTURE. ....	41
FIGURE 8	AUGMENTATION DE CALCIUM INTRACELLULAIRE MESURÉE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE CHEZ LES CHONDROCYTES BOVINS EN CULTURE.....	43
FIGURE 9	INHIBITION D'AMPC PAR L'ANTAGONISTE AH 23 848B CHEZ LES CHONDROCYTES BOVINS EN CULTURE. ....	45
FIGURE 10	EFFET DE L'ANTAGONISTE AH 23 848 SUR LA PRODUCTION D'AMPC PRODUITE PAR LA CARBAPROSTACYCLINE. ....	44

## FIGURE 12 ACTIVITÉ DE MÉTALLOPROTÉASES PAR LES CHONDROCYTES BOVINS EN

CULTURE.....50



## **LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU I : LISTE DES AGONISTES.....	16
TABLEAU II : LISTE DES ANTAGONISTES .....	16
TABLEAU III : SECONDS MESSAGERS.....	17

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AH 23 848B	Acide [1 $\alpha$ (z),2 $\beta$ ,5 $\alpha$ ]-( $\pm$ )-7- $\alpha$ [5-[[1,1'-biphényl]-4-yl]méthoxy]-2- (4-morpholiny)-3-oxoxycopentyl]-4-hepténoïque
AH 6809	Acide 6-isopropoxy-9 oxoxanthène-2-carboxylique
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AMPc	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
APMA	p-aminophényl-mercuric acétate
BSA	Albumine Sérique Bovine
DMEM	Dulbelcco's Modified Eagle Medium
EIA	Enzyme Immuno Assay
FBS	Sérum Fétal Bovin
GR 63 799	[1R-[1 $\alpha$ (Z),2 $\beta$ (R*),3 $\alpha$ ]-(-)-4-benzoylamino)phényl-7-[3-hy-roxy-3-phénoxypropoxy)-5-oxocyclopentyl]-4-hepténoate
IBMX	3- isobutyl-1-méthylxantine
ICI 81 008	$\omega$ -tetranor-16- <i>m</i> -trifluorométhylphenoxy PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>
IL-1	Interleukine-1
MB 28 767	Acide (15S-hydroxy-9-oxo-16-phénoxy- $\omega$ -tétranorprost-13E-énoïque)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PBS	Tampon Phosphate salin
PR	Polyarthrite rhumatoïde
Ptx	Toxine Pertussis

SC-19220	1-acétyl-2-(8-chloro-10,11-dihydodibenz[b,f][1,4]oxazépine-10-carbonyl) hydrazine
SMS 202-995	(D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol))
TIMP	Inhibiteur tissulaires des métalloprotéases
TNF $\alpha$	Facteur nécrosant tumoral
TRIS	Tris(hydroxyméthylaminométhane)
U46619	Acide 11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -époxy méthano-15S-hydroxy-prosta-5Z,13E-diénoïque

## LISTE DES PRODUITS UTILISÉS

1,10-phénanthroline	Fisher
1,9 diméthyl méthylène bleu	Aldrich
11-deoxy-PGE <sub>1</sub>	Cayman
17-phényl- $\omega$ -trinor-PGE <sub>1</sub>	Cayman
3- isobutyl-1-méthylxantine (IBMX)	Sigma
Acide formique	Fisher
Acide Perchlorique	Fisher
AH 23 848B	Dr. R.A. Coleman, Glaxo.
Albumine Bovine	Sigma
APMA	Fisher
Azocoll	Sigma
Bradykinine	Sigma
Butaprost	Dr. H. Kluender, Bayer Corporation
CaCl <sub>2</sub>	Fisher
Carbaprostacycline	Sigma
Chondroïtine Sulfate	Fisher
Collagénase type II	Sigma
Dextrose.	Fisher
Dithiothréitol	Fisher
DMEM	Sigma
DMEM Sans Inositol	Sigma
Dowex Ag 1X8 Formate	Bio-Rad
EIA AMPc	Cayman
FBS	ICN Biomedical Inc.
Fluo3-AM	Molecular Probes Inc.
Formate d'ammonium	Fisher
Forskoline	ICN Biochemicals
Fréon	Sigma
Glycine	Fisher
HCl	Fisher
Hepes	Sigma
Hyaluronidase type III	Sigma
Iodoacétamine	Sigma
Liquide à Scintillation	Beckman
M 199	Gibco
MB 28767	Rhône-Poulenc
Myo- [2- <sup>3</sup> H ] Inositol	Amersham
NaCl	Fisher
NaOH	Fisher
Penicilline	Sigma
PGD <sub>2</sub>	Cayman

PGE<sub>2</sub>  
Poly-L-Lysine  
Réactif de Bradford  
SMS 201-995  
Streptomycine  
Sulprostone  
Toxine Pertussis  
Tri-N-Octylamine  
Tris  
Trypsine (porcine)

Amersham  
Sigma  
Bio-Rad  
Dr. J. Morisset, Sherbrooke  
Sigma  
Prof. H. Vorbrüggen, Schering  
Sigma  
Sigma  
Boehringer Mannheim  
Sigma

## RÉSUMÉ

Université de Sherbrooke  
**Caractérisation des récepteurs aux prostaglandines  
chez les chondrocytes bovins en culture**

par

Caroline Patry

Département de pharmacologie  
Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc.)  
Novembre 1996

Les prostaglandines sont des médiateurs importants de l'inflammation. Elles ont des effets néfastes sur le cartilage en augmentant la synthèse des métalloprotéases et en inhibant la production des glycosaminoglycans. Dans les maladies articulaires, une augmentation de cytokines est observée tel l'interleukine-1 et le  $\text{TNF}\alpha$ . L'action des cytokines serait probablement médiée au moins en partie, via la libération de prostaglandines. Lorsque les chondrocytes sont stimulés avec des doses croissantes d'IL-1 et de  $\text{TNF}\alpha$ , une production de  $\text{PGE}_2$  est observée. L'action des prostaglandines est médiée via des récepteurs spécifiques dont il existe quatre sous-types soit,  $\text{EP}_1$ ,  $\text{EP}_2$ ,  $\text{EP}_3$  et  $\text{EP}_4$ . L'objectif du travail est de caractériser le sous-type de récepteur présent chez les chondrocytes bovins en culture. Le sous-type  $\text{EP}_1$  est couplé à l'augmentation de calcium intracellulaire et d'inositol triphosphate. Dans notre modèle, aucune augmentation de calcium intracellulaire et d' $\text{IP}_3$  n'a été observée après stimulation à la  $\text{PGE}_2$ , ce qui laisse croire que le sous-type  $\text{EP}_1$  n'est pas présent chez les chondrocytes bovins. Les sous-types  $\text{EP}_2$  et  $\text{EP}_4$  sont couplés à l'adénylate cyclase et augmentent l'AMPc intracellulaire. Chez les chondrocytes bovins après stimulation avec  $\text{PGE}_2$  et 11-deoxy  $\text{PGE}_1$  (agoniste  $\text{EP}_2$  et  $\text{EP}_4$ ) une augmentation d'AMPc dose-dépendante est observée tandis que le Butaprost (agoniste  $\text{EP}_2$ ) n'a pas eu d'effet sur l'augmentation d'AMPc. Les agonistes  $\text{EP}_1$  et  $\text{EP}_3$  n'ont pas eu d'effets sur cette augmentation. L'antagoniste  $\text{EP}_4$  (AH 23 848B) a déplacé la courbe dose-réponse de la  $\text{PGE}_2$  vers la droite, ce qui nous laisse croire que les chondrocytes bovins possèdent un récepteur de sous-type  $\text{EP}_4$ . Le sous-type  $\text{EP}_3$  possède différents isoformes soit  $\text{EP}_{3A}$ ,  $\text{EP}_{3B}$ ,  $\text{EP}_{3C}$ ,  $\text{EP}_{3D}$  couplé à différents seconds messagers pouvant mener à l'inhibition ou l'augmentation d'AMPc ou l'augmentation d' $\text{IP}_3$ . Aucun effet avec les agonistes  $\text{EP}_3$  n'a été observé. Les sous-types  $\text{EP}_3$  ne semblent pas présent chez les chondrocytes bovins en culture. Comme le sous-type  $\text{EP}_3$  peut être couplé à différents seconds messagers, nous pourrions être en présence de deux isoformes qui ont des effets opposés, masquant ainsi la réponse à l'AMPc. Nous avons vérifié à l'aide de la toxine pertussis et aucun récepteur à la  $\text{PGE}_2$  couplé à une protéine  $\text{Gi}$  n'est présent chez les chondrocytes bovins. Donc, chez les chondrocytes nous ne sommes pas en présence de sous-type  $\text{EP}_3$  sous aucun isoforme. Nous pouvons donc conclure que les chondrocytes bovins possèdent un récepteur  $\text{EP}_4$  et ne possèdent pas de sous-type  $\text{EP}_1$ ,  $\text{EP}_2$  et  $\text{EP}_3$ . Nous avons voulu voir l'effet de la  $\text{PGE}_2$  sur le cartilage. Dans notre modèle la  $\text{PGE}_2$  n'a pas eu d'effet sur la libération de glycosaminoglycans tandis qu'elle a augmenté la production de métalloprotéases et cette augmentation est médiée via le récepteur  $\text{EP}_4$ .



## INTRODUCTION

Les maladies rhumatismales constituent un groupe de plusieurs dizaines d'entités nosologiques différentes, dont la polyarthrite rhumatoïde (PR) et l'arthrose sont les plus connues. Ces deux maladies affectent de 1 à 4% de la population en général (MCCARTY ET KOOPMAN, 1993), et leur incidence et prévalence augmentent avec l'âge pouvant atteindre 30% chez les personnes de 70 ans et plus et 70% chez les personnes âgées de 75 ans et plus (MCCARTY ET KOOPMAN, 1993). L'importance de ces pathologies des points de vue médical et économique est donc immense et indéniable, surtout en considérant l'augmentation progressive de la moyenne d'âge que les pays développés connaissent actuellement. La PR est une affection inflammatoire chronique, d'étiologie inconnue, qui frappe les articulations, les déforme et les détruit (MCCARTY ET KOOPMAN, 1993). L'arthrose est une maladie dégénérative des articulations, plus spécifiquement du cartilage articulaire, qui entraîne aussi des limitations fonctionnelles considérables (KELLEY *et al.*, 1993). Les hommes comme les femmes sont atteints par ces maladies et, dans le cas de la PR, même les enfants peuvent être affectés.

Dans ces deux pathologies on observe une dégénérescence du cartilage articulaire. Même si la pharmacologie moderne a produit des médicaments capables de diminuer l'inflammation, la douleur et, dans le cas de la PR, d'induire une rémission de la maladie (MCCARTY ET KOOPMAN, 1993), nous ne disposons pas encore de moyens de contrer la destruction articulaire en agissant directement sur le cartilage pour le protéger. Pour mieux identifier les approches possibles à ce problème, et surtout celle



que nous avons choisi de suivre, dans les pages suivantes nous reverrons quelques concepts fondamentaux concernant la physiologie et la physiopathologie du cartilage articulaire.

## **1. Cartilage**

Le cartilage articulaire est un tissu blanchâtre, de surface lisse et brillante, dont les fonctions sont de faciliter la mobilité des articulations avec un minimum de friction et d'amortir les chocs mécaniques. Il est composé d'éléments cellulaires, les chondrocytes, et d'une matrice extracellulaire.

### **1.1 Les chondrocytes**

Les cellules qui forment le cartilage sont appelées chondrocytes. Les chondrocytes sont contenus dans des lacunes ovalaires ou arrondies appelées chondroplastes. Il existe trois types de cartilage : le cartilage hyalin, le fibrocartilage et le cartilage élastique (HOULD, 1982). Le fibrocartilage se trouve dans la symphyse pubienne, dans les disques intervertébraux et dans les ménisques des genoux; ce tissu allie la force et la rigidité. Le cartilage élastique offre de la force et de la malléabilité tout en aidant à maintenir la forme de certains organes comme l'épiglotte, le pavillon auriculaire et les trompes d'Eustache. Le cartilage hyalin est le plus abondant de l'organisme. Il participe à la formation du nez, du larynx, de la trachée, des bronches et des voies bronchiques. Le squelette embryonnaire est, en grande partie, fait de cartilage

hyalin. Il est aussi présent au niveau des articulations des extrémités des os longs, où on l'appelle cartilage articulaire, et forme les cartilages costaux aux extrémités ventrales des côtes. Chez l'adulte on distingue quatre couches dans le cartilage articulaire (MCCARTY ET KOOPMAN, 1993): une couche superficielle où les chondrocytes sont petits et plats, une couche moyenne où ils sont gros et ronds, une couche radiale où ils ont tendance à se déposer en colonnettes parallèles et une couche de cartilage calcifié qui repose sur une lame osseuse sous-chondrale.

## 1.2 La matrice extracellulaire

La matrice du cartilage articulaire est composée de fibres de collagène, de protéoglycans, et d'eau (KELLEY *et al.*, 1993). Les fibres de collagène forment un feutrage très serré, les superficielles étant parallèles à la surface du cartilage et les profondes verticales et ancrées dans la lame osseuse sous-chondrale. Le collagène principal de l'articulation est de type II contrairement à la peau qui possède du collagène de types I et III. On retrouve également dans le cartilage du collagène de type V, VI, IX, X, XI en moindres quantités. La substance fondamentale située entre les fibres de collagène est composée de complexes protéine-polysaccharides (protéoglycans), d'eau et d'électrolytes. Les protéoglycans sont formés de plusieurs chaînes de glycosaminoglycans insérées sur une chaîne polypeptidique longue d'environ 300 nm (KELLEY *et al.*, 1993). Les glycosaminoglycans sont des polyosides constitués d'unités dissaccharidiques répétées: chondroïtine-6-sulfate, chondroïtine-4-sulfate et kératan-sulfate. L'unité dissaccharidique des chondroïtines-sulfates est faite de

N-acétylgalactosamine et d'acide glucuronique, celle du kératan-sulfate de galactose et de N-acétyl-glucosamine. Le chondroïtine-6-sulfate est le principal glycosaminoglycan du cartilage. Les protéoglycans possèdent une forte charge négative qui attire les molécules d'eau aux régions comprises entre les chaînes latérales de glycosaminoglycans. Lorsque la pression mécanique devient trop importante, les molécules d'eau sont expulsées permettant ainsi d'amortir les chocs et la pression. Une fois la pression mécanique disparue l'eau revient et occupe l'espace perdu. Ces caractéristiques confèrent au cartilage une fonction de ressort biologique hautement efficace (KELLEY *et al.*, 1993). Le cartilage articulaire est dépourvu de vaisseaux et de nerfs, il est nourri par des éléments contenus dans le liquide synovial.

## **2. La physiologie et la physiopathologie du cartilage articulaire**

Le cartilage est un tissu vivant qui se remodèle continuellement, ayant donc besoin de défaire la matrice et de la reconstruire. Le chondrocyte est le seul type cellulaire présent dans ce tissu et cumule les fonctions anaboliques et cataboliques. Du contrôle de ces deux fonctions dépend l'intégrité tissulaire. Les fonctions anaboliques les plus importantes sont la production de collagène, de protéoglycans et d'inhibiteurs enzymatiques spécifiques. La contrepartie catabolique comprend la production d'enzymes nécessaires à la dégradation des éléments de la matrice. Des études récentes, décrites ci-bas, suggèrent une importance spéciale du contrôle de la production des métalloprotéases et de leurs inhibiteurs spécifiques pour le contrôle de la santé du cartilage.



## 2.1 Enzymes impliquées dans le remodelage et destruction du cartilage

Les enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire sont les protéinases et les endopeptidases. Il existe quatre classes de protéinases, soit l'aspartate et la cystéine protéinase qui sont actives à pH acide, et les sérines protéinases et les métalloprotéinases actives à pH neutre ou alcalin (KELLEY *et al.*, 1993). Ces quatre protéinases, dont les métalloprotéases sont les plus importantes (VINCENTI *et al.*, 1994) pour le cartilage, sont produites et secrétées par les chondrocytes. La principale aspartate protéinase est la cathepsine D, qui est retrouvée aussi dans les lysosomes de plusieurs autres types cellulaires. La cathepsine D peut dégrader les protéoglycans du cartilage (KELLEY *et al.*, 1993). Les cathepsines B et L sont des cystéines protéinases, et leur principale action est de couper les peptides de collagène dans la portion NH<sub>2</sub> terminal (KELLEY *et al.*, 1993). La cathepsine B coupe aussi la liaison de l'acide hyaluronique avec les protéoglycans et dégrade les glycosaminoglycans (KELLEY *et al.*, 1993). Les sérines protéinases les plus actives sur le cartilage sont les plasmines, l'élastase et la cathepsine G qui agissent comme activateurs des métalloprotéases (KELLEY *et al.*, 1993). Les métalloprotéases (MMP) sont classés en trois groupes (VINCENTI *et al.*, 1994). Le groupe 1 comprend la collagénase interstitielle (MMP-1) et la collagénase des neutrophiles (MMP-8); leurs principaux substrats sont les collagènes de types I, II, et III. Le mécanisme d'action des collagénases est de couper entre les résidus glycine et isoleucine du collagène. Elles sont produites par les macrophages, les fibroblastes, les

synoviocytes, les ostéoblastes, les chondrocytes et les cellules endothéliales. Les métalloprotéases du groupe 2 sont la gélatinase A (MMP-2) et la gélatinase B (MMP-9), leurs substrats étant la gélatine et le collagène de type IV. Le groupe 3 comprend la stromélysine 1 (MMP-3), la stromélysine 2 (MMP-10) et la pump-1 (MMP-7). La stromélysine est active sur les protéoglycans et les collagènes de type IV, V, VII, IX, la laminine, et la fibronectine. La stromélysine est synthétisée en coordination avec la collagénase, mais leur régulation est indépendante. Dans les maladies articulaires la collagénase (MMP-1) et la stromélysine (MMP-3) jouent un rôle important (HARRIS 1990; WERB, *et al.*, 1989). Dans les conditions normales, la synthèse de ces enzymes par les chondrocytes est faible mais elle augmente sensiblement dans le cartilage de l'arthrose (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 1984; PELLETIER *et al.*, 1987; PELLETIER *et al.*, 1983a, 1983b) et de la PR (VINCENTI *et al.*, 1994). Il est probable que des interleukines telles que l'IL-1, le EGF, le PDGF, et le  $TNF\alpha$  soient les inducteurs de la synthèse des collagénases et des stromélysines dans ces situations (HARRIS, 1990; WERB, *et al.*, 1989).

## 2.2 Inhibiteurs des protéases

Malgré leur potentialité destructrice envers le cartilage les métalloprotéases sont nécessaires pour le remodelage physiologique de ce tissu. Il est donc important de pouvoir bien maîtriser leur production et leur activité pour garder l'intégrité du cartilage. À part le contrôle de la production de ces enzymes leurs activités sont affectées par la

présence d'inhibiteurs endogènes. L'inhibiteur majeur de la collagénase et des autres métalloprotéases dans le plasma et le liquide synovial est l' $\alpha_2$  macroglobuline ( $\alpha_2$ M) (KELLEY *et al.*, 1993), tandis que dans les tissus ce sont les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (tissue inhibitors of metalloproteases - TIMPs) qui assument cette tâche (KELLEY *et al.*, 1993). Les TIMPs sont produits par beaucoup de types cellulaires tels les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les chondrocytes (KELLEY *et al.*, 1993). Le cartilage humain produit des TIMPs (DEAN *et al.*, 1984, 1987). La production de TIMP dans l'arthrose est diminuée tandis que les protéinases sont trois fois plus élevées (AZZO *et al.*, 1986; DEAN *et al.*, 1987) que la normale. Le déséquilibre entre les métalloprotéases et les TIMPs doit être un facteur pathophysiologique important pour la destruction du cartilage (MAROUDAS *et al.*, 1986).

### 2.3 Éléments impliqués dans le contrôle du métabolisme cartilagineux

Les cytokines sont des médiateurs importants dans les situations normales et pathologiques. (KELLEY *et al.*, 1993). L'interleukine-1 (IL-1) et le  $\text{TNF}\alpha$  sont des médiateurs importants lors de l'inflammation et dans la destruction articulaire (GILMAN 1987). Au niveau du cartilage, l'Il-1 a beaucoup d'effets. L'Il-1 stimule la production de collagénase et d'autres protéinases neutres, ainsi que des prostaglandines (KELLEY *et al.*, 1993). Elle altère la synthèse de collagène, réduit la formation de collagène de type II et augmente la synthèse de collagène de type I et III (KELLEY *et al.*, 1993). Au niveau des protéoglycans, l'Il-1 a des effets complexes en inhibant leurs



synthèses et en augmentant leur dégradation (ARNER *et al.*, 1989, KELLEY *et al.*, 1993). Des résultats expérimentaux montrent que l'Il-1 induit la dégradation d'explants de cartilage humain et augmente la synthèse de prostaglandines (CAMPBELL *et al.*, 1990, CHIN *et al.*, 1988). Le  $\text{TNF}\alpha$  stimule la collagénase, la production de  $\text{PGE}_2$  par les synoviocytes et d'autres fibroblastes, et joue un rôle dans l'inflammation de la synoviale. (KELLEY *et al.*, 1993). Il inhibe la synthèse des protéoglycans (IKEBE *et al.*, 1988, 1986, SAKLATVALA, 1986) et du collagène de type II (GOLDRING *et al.*, 1990). Le TNF induit la perte de la matrice extracellulaire du cartilage dans l'arthrite rhumatoïde et l'ostéoarthrite (LEONG *et al.*, 1993)

Il-1 et le  $\text{TNF}\alpha$  induisent la synthèse de prostaglandines (KELLEY *et al.*, 1993). Les prostaglandines pourraient agir comme médiateur des cytokines car il a été démontré que l'effet de l'IL-1 sur la dégradation d'explants de cartilage humain est inhibé par un inhibiteur de la cyclooxygénase, le Tenoxicam, et qu'en ajoutant de la  $\text{PGE}_2$  exogène, on retrouve l'effet produit par l'IL-1 (PELLETIER *et al.*, 1989). Ces résultats suggèrent que les prostaglandines sont des médiateurs des cytokines.

### 3. Les prostaglandines

Les premières activités associées aux prostaglandines ont été identifiées en 1930 par KURZROK et LIEB dans le liquide séminal humain. Par la suite, en 1957, le groupe de BERGSTRÖM et SJÖVALL a purifié les premières prostaglandines, soit  $\text{PGE}_1$  et  $\text{PGF}_{1\alpha}$ . Au milieu des années 1970 il est devenu clair que les prostaglandines sont des



médiateurs lipidiques puissants et participent à un grand nombre d'effets physiologiques. (COLEMAN *et al.* 1994b)

### 3.1 Synthèse

Les prostaglandines sont composées d'acides gras de 20 atomes de carbones contenant un noyau cyclopentanique. Elles sont libérées des membranes lipidiques par la phospholipase  $A_2$  à partir d'un précurseur, soit l'acide dihomog- $\gamma$ -linolénique, l'acide arachidonique ou l'acide timodinique. Chez la plupart des espèces, l'acide arachidonique est le précurseur le plus important. En présence d'oxygène, l'acide arachidonique peut être transformé par les cyclooxygénases, en endopéroxydes  $PGG_2$  et par la suite en  $PGH_2$  par une hydropéroxydase. L'enzyme qui fait l'action cyclooxygénase et l'action hydropéroxydase est appelé Prostaglandine endopéroxyde synthase (PGH synthase ou cyclooxygénase). Il existe deux isoformes de PGH synthase soit la PGH synthase-1 et la PGH synthase-2 (HLA *et al.*, 1992). La PGH synthase-1 est présente dans les cellules endothéliales vasculaires (DEWITT *et al.*, 1983), les plaquettes (FUNK *et al.*, 1991), les reins (SMITT *et al.*, 1978) et plusieurs autres tissus (XIE *et al.*, 1991; HLA *et al.*, 1992). Elle possède un niveau stable elle n'est pas stimulée par les hormones, ni par des facteurs de croissance, et son gène a les caractéristiques d'un "Housekeeping gene". PGH synthase-2 est présente dans plusieurs tissus tels les ostéoblastes (DE BRUM FERNANDES *et al.*, 1994), les fibroblastes, les synoviocytes durant l'inflammation (KUJUBU *et al.*, 1991), les macrophages et monocytes (O'SULLIVAN *et al.*, 1992). Certains facteurs stimulent la production de PGH synthase-2 tels le sérum (O'BANION

*et al.*, 1992), l'endotoxine (lipopolysaccharide, LPS), les phorbol esters (HLA *et al.*, 1992), l'ionophore de calcium (HERSHMAN, 1992, O'BANION *et al.*, 1992), l'IL-1 et d'autres cytokines (MITCHELL *et al.*, 1992). Tandis que les glucocorticoïdes la diminuent (O'BANION *et al.*, 1991, O'BANION *et al.*, 1992). PGH synthase-1 est une enzyme constitutive tandis que PGH synthase-2 est une enzyme inductible responsable de la production des prostanoïdes dans l'inflammation et dans d'autres pathologies où la prolifération cellulaire est impliquée (VANE 1992).

PGH<sub>2</sub> est rapidement converti par différentes enzymes en prostaglandines. PGI synthase catalyse la formation de prostacycline, PGE synthase des PGE<sub>1</sub>, PGD synthase de PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> synthase de la PGF<sub>2α</sub> et TXA synthase de thromboxane. Les prostaglandines sont désignées par les lettres A à I. La nomenclature des prostaglandines est déterminée à partir de la structure chimique de la molécule. Le numéro après la lettre indique la présence de doubles liaisons, donc 1 signifie une double liaison entre le carbone 13 et le carbone 14, 2 signifie une double liaison additionnelle entre les carbones 5 et 6, et 3 signifie une troisième double liaison entre les carbones 17 et le 18. Les prostaglandines doivent leur nom au fait qu'on les a d'abord isolées à partir du liquide séminal.

### 3.2 Effets Biologiques

Les prostaglandines sont des modulateurs d' une variété de réponses physiologiques et pathologiques.

$\text{PGI}_2$  est produite majoritairement par les cellules endothéliales. Il s'agit d'une substance vasodilatatrice qui joue un rôle inhibiteur dans le contrôle du tonus vasculaire. Elle augmente la perméabilité vasculaire et inhibe l'aggrégation plaquettaire (OLIVA *et al.* 1987). La  $\text{PGI}_2$  est aussi un médiateur des réponses excitatrices au niveau du système nerveux. Les récepteurs à la  $\text{PGI}_2$  sont localisés dans les plaquettes sanguines, les muscles lisses vasculaires et les nerfs sensitifs afférents.

Thromboxane  $\text{A}_2$  est une substance vasoconstrictrice et un puissant aggrégant plaquettaire (MALMSTEN 1976). Elle est hydrolysée rapidement en composé inactif, soit Thromboxane  $\text{B}_2$ .

Les réponses médiées par  $\text{PGD}_2$  sont de nature inhibitrice, c'est à dire l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire, la relaxation des muscles lisses, l'inhibition de la relâche de neurotransmetteur (COLEMAN *et al.*, 1994b). Le sommeil est induit par la  $\text{PGD}_2$  (KATZUNG, 1989).

$\text{PGF}_{2\alpha}$  est présent dans le corpus luteum et son rôle est fondamental dans le cycle reproductif de la femelle (SENIOR *et al.*, 1992). Il est aussi présent dans les muscles du sphincter de l'iris (CAMRAS *et al.*, 1992). L' analogue le  $\text{PGF}_{2\alpha}$  -1-isopropyl ester est utilisé pour diminuer la pression intraoculaire dans le traitement du glaucome (CAMRAS *et al.*, 1989; WOODWARD *et al.*, 1989).  $\text{PGF}_{2\alpha}$  serait également impliquée dans les



fonctions rénales, car la présence d'un récepteur a été démontrée dans les cellules mésangiales de rat. ( MENÉ *et al.*, 1987). Le récepteur de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est exprimé dans les poumons et cause une bronchoconstriction (COLEMAN 1987a).

La  $\text{PGE}_2$  est présente au niveau du système nerveux central, où elle augmente la température, inhibe la relâche de norepinéphrine, stimule la relâche d'hormones de croissance, de prolactine, TSH, ACTH, FSH, LH (KATZUNG, 1989). Au niveau de l'estomac,  $\text{PGE}_2$  a un effet protecteur en inhibant la sécrétion gastrique et en maintenant une barrière pour la muqueuse gastrique. Dans les reins,  $\text{PGE}_2$  participe à la filtration glomérulaire, augmente la réabsorption d'eau et de sodium.  $\text{PGE}_2$  stimule la relâche de catécholamines et augmente la relâche de rénine.

Le rôle précis des prostaglandines dans l'inflammation n'est pas encore totalement compris. Plusieurs travaux supportent la participation des prostaglandines dans le développement de la réponse inflammatoire. De grandes quantités de prostaglandines sont détectées dans le foyer inflammatoire chez les patients atteints de PR. Le tissu synovial secrète beaucoup de prostaglandines (DAYER *et al.*, 1977, MCCARTY ET KOOPMAN, 1993). Les patients atteints d'ostéoarthrite ont un niveau augmenté de prostaglandines dans leur liquide synovial (ATIK, 1990). Les prostaglandines jouent un rôle important de la régulation du métabolisme du cartilage (MALEMUD *et al.*, 1977). Les chondrocytes produisent des prostaglandines telles que  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  et  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (MALEMUD *et al.*, 1981). La synthèse des prostaglandines peut être induite par l'interleukine-1 et le  $\text{TNF}_\alpha$  (CAMPELL *et al.*, 1990; CHIN *et al.*, 1988). Les prostaglandines seraient des intermédiaires dans la réduction de la synthèse des

protéoglycans induite par l'IL-1 (BOQUET *et al.*, 1986; GILMAN, 1987), et participeraient à la pathophysiologie de la destruction du cartilage (VIGON *et al.*, 1989)

### 3.3 Récepteurs des prostaglandines

#### 3.3.1 Historique

Les prostaglandines exercent leurs actions via des interactions avec des récepteurs spécifiques. BENNET *et al.* (1968) ont démontré que  $\text{PGE}_2$  et  $\text{PGE}_1$  contractent les muscles longitudinaux intestinaux chez l'homme, le cobaye et le rat et relaxe les muscles circulaires intestinaux, donc la possibilité de deux sous-types de récepteurs. En 1969 SANNER *et al.* développèrent un antagoniste de  $\text{PGE}_2$ , le SC 19220. Cet antagoniste a permis de décrire deux sous-types de récepteurs pour les prostaglandines  $\text{E}_2$ , un sensible au SC-19220 et un autre sous-type de récepteur insensible à ce composé ( BENNET *et al.* 1971). L' hypothèse de Bennet fut confirmée par COLEMAN. *et al.* en 1979, avec le SC-19220 et en 1985 avec le AH6809 (COLEMAN *et al.*, 1985b) que les deux composés bloquaient un type de récepteur qu'ils ont nommé  $\text{EP}_1$ , mais non le deuxième type nommé  $\text{EP}_2$ . En 1982, KENNEDY *et al.* ont proposé une classification pour les récepteurs aux éicosanoïdes.  $\text{PGD}_2$  agirait sur le récepteur DP,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sur le récepteur FP, la prostacycline sur le récepteur  $\text{IP}_1$ , Tromboxane  $\text{A}_2$  sur le récepteur TP et la  $\text{PGE}_2$  sur un récepteur inhibé par le composé SC19220 ( $\text{EP}_1$ ) et un autre récepteur non sensible au composé SC19220 ( $\text{EP}_2$ ). En COLEMAN *et al.*, (1987 b)

ont proposé l'existence de deux sous-types d'EP<sub>2</sub>, le sulprostone étant un agoniste puissant sur un récepteur et inactif sur l'autre récepteur, ce qui a donné naissance au sous-type EP<sub>3</sub>. COLEMAN (1994 a) a proposé qu'il existe un quatrième sous-type de récepteurs, le EP<sub>4</sub>, caractérisé à l'aide d'un antagoniste pour le récepteur aux thromboxanes, le AH23848B, qui bloque la réponse à la PGE<sub>2</sub> sur la veine saphène de porcelet, mais pas sur des préparations tissulaires de types EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> ou EP<sub>3</sub>. La veine saphène de porcelet possède donc un sous-type de récepteur à la PGE<sub>2</sub> nommé EP<sub>4</sub>.

### 3.3.2 Sous-types de récepteurs à la PGE<sub>2</sub>

Les sous-types de récepteurs aux prostaglandines sont caractérisés pharmacologiquement à l'aide d'agonistes et d'antagonistes. Jusqu'à maintenant quatre sous-types de récepteurs à la PGE<sub>2</sub> ont été caractérisés pharmacologiquement et la séquence d'ADN est connue pour les quatre sous-types.

Le type EP<sub>1</sub> est impliqué dans la contraction des muscles lisses longitudinaux de l'iléum de cobaye, du fundus et de la trachée (COLEMAN. *et al.*, 1985c), du tractus gastro-intestinal (LAWRENCE *et al.*, 1992b; EGLIN *et al.*, 1988), du tractus respiratoire (COLEMAN. *et al.*, 1985c; MCKENNIFF *et al.*, 1988), du vas déférens (HEDGVIST *et al.*, 1972), du myomètre (SENIOR. *et al.*, 1991), des muscles du sphincter de l'iris (DONG *et al.*, 1986), ainsi que dans l'inhibition de l'absorption de l'intestin grêle (BUNCE *et al.*, 1987), dans l'augmentation de l'activité neuronale par la PGE<sub>2</sub> (EHRENPREIS *et al.*, 1973). La stimulation du sous-type EP<sub>2</sub> produit une relaxation de la trachée de chat (GARDINER *et al.*, 1986), du muscle circulaire de

l'ileum (LAWRENCE *et al.* 1992b), et du corps ciliaire de l'iris (CSUKAS *et al.*, 1992) et stimule la réabsorption d'eau et de sel dans les tubules rénaux (GRANTHAM *et al.*, 1968; SONNENBURG *et al.*, 1988); il a été proposé que le sous-type EP<sub>2</sub> régulerait négativement le système immunitaire (MONICK *et al.*, 1987) et l'inflammation (COLEMAN. *et al.*, 1990). L'activation du sous-type EP<sub>3</sub> induit la contraction de l'ileum de poulet (COLEMAN. *et al.*, 1987c), inhibe la relâche de neurotransmetteur (EDET *et al.*, 1990), contracte l'utérus (KRALL *et al.*, 1984), inhibe la réabsorption d'eau et de sel dans les tubules rénaux (NAKAO *et al.*, 1989), stimule la relâche de catécholamines des cellules chromaffines surrénaliennes (TANAKA *et al.*, 1990), inhibe la sécrétion gastrique d'acide (CHEN *et al.*, 1988) et inhibe la lipolyse dans le tissu adipeux (RICHELSEN *et al.*, 1984).

Des agonistes et des antagonistes spécifiques aux sous-types de récepteurs ont été développés. Le tableau montre les composés actuellement disponibles ainsi que leurs spécificités.



**Tableau I : Liste des Agonistes**

Agoniste	Sous-type de récepteur	Références
Butaprost	EP <sub>2</sub>	GARDINER <i>et al.</i> , 1986
11-deoxy- PGE <sub>1</sub>	EP <sub>2</sub> /EP <sub>4</sub>	DONG <i>et al.</i> 1986/ NISHIGAKI <i>et al.</i> , 1995
IC 80205	EP <sub>1</sub>	DONG <i>et al.</i> , 1986
16,16 dimethyl PGE <sub>2</sub>	EP <sub>1</sub>	DONG <i>et al.</i> , 1986
Iloprost	EP <sub>1</sub>	SHELDRIK <i>et al.</i> , 1988
17-phenyl- $\omega$ -trinor PGE <sub>2</sub>	EP <sub>1</sub>	LAWRENCE <i>et al.</i> , 1992b
Misoprostol	EP <sub>3</sub> /EP <sub>2</sub>	COLEMAN. <i>et al.</i> , 1988
Sulprostone	EP <sub>3</sub> /EP <sub>1</sub>	BUNCE <i>et al.</i> , 1990
Enprostil	EP <sub>3</sub>	REEVES <i>et al.</i> 1988
GR63799	EP <sub>3</sub>	BUNCE <i>et al.</i> , 1990
M&B 28767	EP <sub>3</sub>	LAWRENCE <i>et al.</i> , 1992b

**Tableau II : Liste des antagonistes**

Antagoniste	Sous-type	Références
SC 19220	EP <sub>1</sub>	COLEMAN <i>et al.</i> , 1979
AH 6809	EP <sub>1</sub>	COLEMAN <i>et al.</i> , 1985b
AH 23 848B	EP <sub>4</sub>	COLEMAN <i>et al.</i> , 1994a

### 3.3.3 Seconds messagers

Les récepteurs aux prostaglandines sont couplés à différents seconds messagers

Le tableau qui suit montre le type de récepteur ainsi que le second messenger impliqué

**Tableau III : Second Messenger**

Récepteur	Second Messenger	Références
IP	AMPc	SIEGL <i>et al.</i> , 1979, NAMBA <i>et al.</i> , 1994
	IP <sub>3</sub>	
TP	Ca <sup>2+</sup>	COLEMAN. <i>et al.</i> , 1994b
DP	AMPc	COLEMAN. <i>et al.</i> , 1994b
	Ca <sup>2+</sup>	OKUDA-ASHITAKA <i>et al.</i> , 1993
FP	Ca <sup>2+</sup>	GUSOVKSY, 1991; NAKAO <i>et al.</i> , 1993).
EP <sub>1</sub>	Ca <sup>2+</sup>	CREESE et DENBOROUGH, 1981;
	IP <sub>3</sub>	COLEMAN. <i>et al.</i> , 1985a; WATABE <i>et al.</i> , 1993; FUNK <i>et al.</i> , 1993
EP <sub>2</sub>	↑AMPc	HARDCASTLE <i>et al.</i> , 1982; SONNENBURG <i>et al.</i> , 1990; HONDA <i>et al.</i> 1993
EP <sub>3</sub>	↓ AMPc	REEVES <i>et al.</i> , 1988, STRONG <i>et al.</i> , 1992
EP <sub>4</sub>	↑AMPc	COLEMAN. <i>et al.</i> , 1994 a

Le sous-type EP<sub>3</sub> peut être couplé à différents mécanismes de transduction. Le mécanisme de transduction classique est l'inhibition de l'adénylate cyclase observée dans la l'inhibition de la relâche de neurotransmetteur, dans la sécrétion gastrique (REEVES *et al.*, 1988) et dans la lipolyse (STRONG *et al.*, 1992). Le sous-type EP<sub>3</sub> est impliqué dans l'inhibition de la réabsorption d'eau (NAKAO *et al.*, 1989), cet effet est bloqué par la toxine pertussis ce qui indique que ce sous-récepteur est couplé à une protéine G inhibitrice Dans les systèmes où on observe un inhibition d'AMPc, ces effets sont

inhibés par la toxine pertussis (SONNENBURG *et al.*, 1990; WATANABE *et al.*, 1986, 1991). Dans les glandes surrénales bovines, le récepteur EP<sub>3</sub> est couplé à une protéine G<sub>q</sub> insensible à la toxine pertussis qui stimule la phospholipase C et qui augmente ainsi la relâche des catécholamines. Lors de la contraction des muscles lisses, on observe une augmentation de calcium intracellulaire.(NEGISHI *et al.*, 1989, 1990; YOKOHAMA *et al.*, 1988). On retrouve différents seconds messagers pour le sous-type EP<sub>3</sub> qui sont le résultat d' un épissage alternatif, donnant ainsi différentes isoformes de sous-types d'EP<sub>3</sub>. Chez le boeuf les isoformes EP<sub>3A</sub> et EP<sub>3C</sub> sont couplés à une protéine G<sub>i</sub> qui induit l'inhibition de la production d'AMPc. EP<sub>3B</sub> et EP<sub>3C</sub> sont couplés à une protéine G<sub>s</sub> qui augmente l'AMPc. Enfin, EP<sub>3D</sub> couplé à une G<sub>q</sub> (insensible à la toxine pertussis) qui augmente la mobilisation du calcium intracellulaire et la formation d'IP<sub>3</sub>.

### 3.3.4 Distribution tissulaire

Le récepteur EP<sub>1</sub> est présent dans le rein, le poumon, la rate, les muscles squelettiques et à un niveau faible dans les testicules (FUNK *et al.*, 1993). Le sous-type EP<sub>2</sub> est distribué dans plusieurs tissus dont l'ileum, le thymus, les poumons, la rate, le coeur et l'utérus (HONDA *et al.*, 1993). Le sous-types EP<sub>3</sub> est présent dans les reins, l'utérus, l'estomac, la rate, les poumons, le cerveau (SUGIMOTO *et al.*, 1992). Dans les reins, le récepteur EP<sub>3</sub> est distribué dans les tubules de la médulla, dans les tubules distaux ainsi que dans la macula densa (SUGIMOTO *et al.*, 1994b). Dans le système nerveux le sous-types EP<sub>3</sub> est présent dans les neurones, l'hippocampe, le noyau

préoptique, l'hypothalamus, le corps maxillaire, le locus coeruleus et le noyau raphe (SUGIMOTO *et al.*, 1994c).

### 3.3.5 Biologie Moléculaire

Les récepteurs aux prostaglandines sont des récepteurs de type "rhodopsine like", à sept domaines transmembranaires, couplés à une protéine G spécifique. Les cDNAs des récepteurs ont tous été clonés. IP a été cloné chez la souris par le groupe de NAMBA *et al.*, (1994), et chez l'humain par l'équipe de BOIE *et al.*, (1994). TP a été cloné par l'équipe de NAMBA *et al.* chez la souris (1992) et chez l'humain par HIRATA *et al.* (1991). L'ARNm du récepteur a été retrouvé par Northern blot dans plusieurs tissus soit le thymus, la rate, les poumons, les reins, le coeur et l'utérus (NAMBA *et al.*, 1992).

Le cDNA du récepteur FP a été cloné chez la souris par l'équipe de SUGIMOTO *et al.* (1994a) et chez l'humain par l'équipe de ABRAMOVITZ *et al.* (1994). Le récepteur DP a été cloné chez l'humain par le groupe BOIE *et al.* (1995).

Les sous-récepteurs EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, EP<sub>4</sub> ont été clonés. La séquence des protéines révèle la présence d'acides aminés conservés dans les régions des sept domaines transmembranaires, caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G (SAVERES *et al.*, 1992). Il existe deux sites de glycosylation possible à la surface extracellulaire de la protéine, pour EP<sub>1</sub>, Asn -8 et -25, pour le sous-type EP<sub>2</sub> des Asn -7 et -177, et Asn -59 et -64 pour le sous-type EP<sub>3</sub>. Deux résidus cystéine dans la première et seconde boucle extracellulaire peuvent former un pont disulfure. Quatre résidus proline sont présents dans les quatrième, sixième et septième segments transmembranaires. La conservation



du résidu l'arginine en position 338 pour EP<sub>1</sub>, en position 316 pour EP<sub>2</sub> et en position 309 pour EP<sub>3</sub>, suggère qu'il s'agit d' un résidu impliqué dans la liaison des prostanoïdes au récepteur (SUGIMOTO *et al.*, 1993). La multitude de résidus sérine et thréonine dans la partie COOH terminale et dans la troisième boucle cytoplasmique servirait à des sites potentiels de phosphorylation par une protéine kinase. Il est proposé que la phosphorylation est impliquée dans la désensibilisation du récepteur. (HAUSDORFF *et al.*, 1990).

EP<sub>1</sub> a été cloné chez l'humain (FUNK *et al.*, 1993) et la souris (WATABE *et al.*, 1993), EP<sub>2</sub> a été cloné chez la souris (HONDA *et al.*, 1993), le rat (SANDO *et al.*, 1994) et l'humain (SONGZHU *et al.*, 1993, BASTIEN *et al.*, 1994, REGAN *et al.*, 1994). Le clone de l'équipe de BASTIEN possède une séquence et des caractéristiques pharmacologiques différentes de celles du clone de REGAN *et al.* (1994). Il est possible que Bastien ait cloné le sous-type EP<sub>4</sub> (PIERCE *et al.*, 1995) car il a une affinité négligeable ( $K_i = 30 \mu\text{M}$ ) pour le Butaprost qui est un agoniste sélectif pour le sous-type EP<sub>2</sub>. Au contraire le récepteur décrit par REGAN *et al.* montre une affinité élevée pour le Butaprost soit un  $K_i$  de  $1.4 \mu\text{M}$ , donc ce récepteur est classifié EP<sub>2</sub>. Le sous-type EP<sub>3</sub> a été cloné chez la souris (SUGIMOTO *et al.*, 1992) et chez l'homme (YANG *et al.*, 1994). Différentes isoformes du sous-type EP<sub>3</sub> ont été identifiées EP<sub>3 $\alpha$</sub> , EP<sub>3 $\beta$</sub> , EP<sub>3 $\gamma$</sub> , chez la souris (SUGIMOTO *et al.*, 1992; IRIE *et al.*, 1993), EP<sub>3</sub> A-D chez le boeuf (NAMBA *et al.*, 1993) et le lapin (BREYER *et al.*, 1994) et EP<sub>3I</sub>, EP<sub>3II</sub>, EP<sub>3III</sub> chez l'humain (ADAM *et al.*, 1994).

Le gène EP<sub>1</sub> humain est un gène de 1206 paires de bases qui code pour une protéine de 402 acides aminés, de masse moléculaire calculé de 41 858 ayant les



caractéristiques d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G.

Le gène EP<sub>2</sub> humain contient 1464 paires de bases et code pour une protéine contenant 488 acides aminés ayant une masse moléculaire de 53 115. La séquence des protéines suggère qu'il s'agit d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires lié à une protéine G. L'homologie entre la séquence humaine et la séquence de la souris est de 88%. La différence majeure entre les deux récepteurs est la présence de 25 acides aminés supplémentaires dans la portion NH<sub>2</sub> terminale et de 6 acides aminés additionnels dans la troisième boucle extracellulaire. Le deuxième EP<sub>2</sub> cloné code pour une protéine de 358 acides aminés de masse moléculaire de 39 380. Il s'agit également d'un récepteur à sept domaines transmembranaires ayant les caractéristiques des récepteurs aux prostanoïdes. Il possède une homologie de 37% avec EP<sub>1</sub>, 38% avec l'autre EP<sub>2</sub>, 34% avec EP<sub>3A</sub>, 31% avec le récepteur TP et 31% avec FP. Les gènes EP<sub>3i</sub>, EP<sub>3II</sub>, EP<sub>3III</sub> humains codent pour des protéines contenant 390, 388 et 365 acides aminés de masse moléculaire calculé de 43 315, 42 688, 40 507 respectivement. hEP<sub>3i</sub> est homologue à mEP<sub>3α</sub>, hEP<sub>3II</sub> est homologue à EP<sub>3γ</sub> de souris et à EP<sub>3D</sub> de vache. Les séquences de hEP<sub>3i</sub> sont homologues à 85% avec la souris, le rat et la vache. Les différences entre les séquences se retrouvent dans les sept domaines transmembranaires (ADAM *et al.*, 1994). Les isoformes sont produits par épissage alternatif et diffèrent seulement dans la portion carboxyl-terminale. Les isoformes EP<sub>3</sub> ont une affinité semblable pour les études de liaison, mais sont couplés à différents mécanismes de transduction, soit à l'augmentation ou à la diminution de l'AMPc, ou l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Le sous-types EP<sub>3A</sub> est couplé à une protéine G<sub>i</sub>, EP<sub>3B</sub> et EP<sub>3C</sub> serait couplé à une G<sub>s</sub> tandis

que EP<sub>3d</sub> est couplé à une G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub> et à une G<sub>q</sub>. Il a été reporté que EP<sub>3c</sub> stimule la GTPase via une G<sub>s</sub>, inhibe via une G<sub>o</sub> et augmente l'affinité de la liaison du GDP via une G<sub>o</sub>.

Les séquences EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, EP<sub>4</sub> possèdent les domaines spécifiques aux récepteurs des prostanoïdes, la séquence LxxTDxxG dans le deuxième domaine transmembranaire, la séquence QYxPGxWCF dans la deuxième boucle extracellulaire et la séquence NxIxDPW dans le septième domaine transmembranaire.

#### **4. Problématique**

Les chondrocytes ainsi que d'autres cellules présentes au niveau des articulations produisent des prostaglandines sous la stimulation de plusieurs cytokines impliquées dans la pathophysiologie des maladies inflammatoires et dégénératives articulaires, telles que l'IL-1 et le TNF. Les prostaglandines, à leur tour, agissent sur les chondrocytes en reproduisant certains effets de ces cytokines, notamment ceux qui mènent à la dégradation du cartilage. Il est possible, donc, que les prostaglandines soient impliquées dans la chaîne d'événements qui mènent à la destruction de ce tissu. La connaissance des types et des sous-types de récepteurs aux prostaglandines présents chez les chondrocytes pourrait avoir deux conséquences importantes. Premièrement, elle nous permettrait d'utiliser une nouvelle approche à l'étude des effets biologiques des prostaglandines sur ces cellules en utilisant des agonistes et des antagonistes spécifiques. Il serait ainsi possible de déterminer le rôle de chaque prostaglandine comme médiatrice de l'effet des cytokines. Ceci est impossible à faire avec les anti-inflammatoires puisqu'ils inhibent la

cyclooxygénase et donc la production de toutes les prostaglandines. Une deuxième conséquence à long terme serait l'emploi thérapeutique des antagonistes spécifiques pour éviter l'effet des prostaglandines au niveau du cartilage. Cette approche présenterait l'avantage, par rapport aux anti-inflammatoires conventionnels, de ne pas contrer l'effet bénéfique des prostaglandines dans d'autres systèmes. Il serait alors possible d'envisager un traitement de chondroprotection sans les effets indésirables des AINS.

## **BUT DE L'ÉTUDE**

- Déterminer les types de récepteurs aux prostaglandines présents chez les chondrocytes bovins en culture.
- Déterminer s'il y a lieu, le sous-type ou les sous-types de récepteur aux prostaglandines  $E_2$  présents chez les chondrocytes bovins en culture ainsi que les activités biologiques qui y sont reliées.



## MÉTHODES

### 1. Culture cellulaire:

Le cartilage a été prélevé à partir d'un carpe de boeuf obtenus d'un abattoir local. Après le lavage de l'articulation avec du PBS, celle-ci a été ouverte dans des conditions stériles et le cartilage a été prélevé et coupé en fragments d'approximativement 2 x 2 x 0,5 mm. Les fragments de cartilage ont été lavés dans du PBS et digérés pendant 10 minutes dans 0,05% hyaluronidase type III, suivi de 15 minutes dans la trypsine et de 30 minutes dans 0,20% collagénase de type II, afin d'enlever les autres types cellulaires attachés aux fragments de cartilage. Par la suite les fragments de cartilage ont été lavés dans du PBS (sans  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) et incubés toute la nuit dans du DMEM contenant 0,15% de collagénase de type II, 10% FBS, 50 unités/ml de Pénicilline et 150  $\mu\text{g/ml}$  de Streptomycine à 37°C sous agitation afin de libérer les cellules de la matrice. Après digestion, les cellules ont été lavées dans du PBS pour enlever la collagénase présente dans le milieu et mises en culture dans du DMEM contenant 10% FBS, 50 unités/ml de Pénicilline et 150  $\mu\text{g/ml}$  de Streptomycine, à une densité de 25 000 cellules par  $\text{cm}^2$ , à 37 °C, dans une atmosphère de 5% de  $\text{CO}_2$  ,95% air. Le milieu a été changé à tous les trois ou quatre jours, jusqu'à ce que les cellules soient confluentes. Une fois la confluence atteinte, le milieu a été changé pour du milieu contenant 0,2% FBS pendant 24 heures avant chaque essai.

## **2. Production d'AMPc**

Les cellules ont été cultivées dans des plaques à 24 puits, jusqu'à confluence. Le milieu a été changé pour du milieu DMEM sans sérum et contenant 0,1 mM de 3-isobutyl-1-méthylxantine (IBMX) pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules ont été ensuite stimulées avec de la PGE<sub>2</sub> ou avec des analogues pendant 15 minutes. La réaction a été arrêtée en aspirant le milieu et les cellules ont été lysées avec 0,1N HCl à la température de la pièce, pendant 3 heures. Les surnageants ont été conservés à -80° C. L'AMPc présente dans les surnageants a été dosée après acétylation à l'aide d'un EIA commercial. (Cayman). Pour certaines études, les cellules ont été préalablement incubées avec 10 ng/ml de toxine pertussis pendant 12 heures. La concentration de SMS 201-995 utilisée a été de 10<sup>-7</sup> M pour les essais. Les résultats sont exprimés en pmoles d'AMPc / mg protéine. Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford en utilisant une courbe standard faite à l'aide d'albumine bovine (BSA). Les cellules ont été lysées avec 0,25N de NaOH.

## **3. Inhibition d'AMPc**

Le même protocole décrit ci-haut pour la production d'AMPc s'applique sauf que les cellules ont été incubées en présence de 10µM de Forskoline immédiatement avant les stimuli utilisés dans le but de trouver des effets inhibiteurs sur l'adénylate cyclase.

#### 4. Production d'inositol trisphosphate

Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence dans des plaques à 24 puits. La méthode utilisée a été celle décrite par BOULAY *et al.* (1990). Le milieu a été changé pour du DMEM sans inositol, sans FBS et contenant  $10^6$  cpm par ml de myo- [2- $^3\text{H}$ ]-inositol (10-20 Ci par mmol) et incubé pendant 12 heures. Par la suite les cellules ont été lavées avec du PBS contenant 5,5 mM de dextrose. Le milieu a été changé pour 225  $\mu\text{l}$  de milieu M199 contenant 25 mM HEPES, 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  BSA, pH 7,4, pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules ont été stimulées avec  $\text{PGE}_2$  ou les agonistes pendant 5 minutes. La réaction a été terminée en ajoutant 100  $\mu\text{l}$  d'une solution de 17,5% (v/v) d'acide perchlorique et 50  $\mu\text{l}$  de 10 mg  $\text{ml}^{-1}$  de BSA, et le tout a été incubé pendant 30 minutes à 40°C. Les cellules ont été détachées des plaques à 24 puits à l'aide d'un policeman, et centrifugées pendant 5 minutes à 13 000g à 40°C. Le surnageant a été récolté afin d'être neutralisé. La radioactivité présente dans le culot a été comptée dans 5 ml de liquide à scintillation à l'aide d'un compteur à scintillation. Pour neutraliser les surnageants, l'acide perchlorique présente a été extraite avec une solution de 1:1 (v/v) de Fréon et de tri-n-octylamine, mélangé vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une couleur jaune. Après centrifugation pendant 1 minute à 2000 rev/min, trois phases sont obtenues. La phase du bas contient le Fréon et le tri-n-octylamine. Dans la phase du milieu on retrouve le tri-n-octylamine perchlorate. L'échantillon neutralisé se retrouve dans la phase du haut. (DOWNES *et al.*, 1986). Après neutralisation les échantillons ont été déposés sur une colonne de résine échangeuse d'anion. (Dowex Ag 1X8 formate).  $\text{IP}_1$ ,  $\text{IP}_2$ ,  $\text{IP}_3$ ,  $\text{IP}_4$  radioactifs ont été séparés par élution successive avec 9 ml de 0,1M acide formique contenant 0.2 M, 0.4 M, 0.8M et 1.0M de formate d'ammonium. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de radioactivité par rapport à la radioactivité de l'échantillon témoin.



## 5. Détermination du calcium intracellulaire

La microscopie confocale a été utilisée pour déterminer la distribution et la concentration de calcium intracellulaire de cellules individuelles. Des chondrocytes bovins ont été mis en culture à raison de 40 000 cellules/ml sur des lamelles de verre de 25 mm dont la surface possède 2,5 µg/ml de poly-L-lysine (BKAILY *et al.* 1994). Les lamelles ont été incubées pendant 72 heures dans du DMEM, et ont ensuite été lavées et incubées pendant 1 heure dans du tampon Tyrode contenant 0,1 % BSA, par la suite 13 µM de Fluo3-AM a été ajouté dans le tampon Tyrode (sans BSA) pendant 15 minutes. Les lamelles ont été placées individuellement dans une chambre d'observation contenant du tampon Tyrode avec 1.8 mM de CaCl<sub>2</sub>. Les cellules ont été examinées à l'aide d'un système scanner argon-laser confocal Molecular Dynamics Multiprobe 2001 équipé d'un microscope inverse epifluorescence Nikon Diapot et d'un objectif achromate Nikon Oil Plan 60 X 1.4 N.A. Le faisceau argon laser de 488 nm (7.5 mV) a été dirigé sur l'échantillon via un filtre primaire dichroïque et a été atténué avec un filtre de densité neutre à 1-3% pour réduire le *photobleaching*. PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup>M), Carbaprostacycline (10<sup>-6</sup>M) ou Bradykinine (10<sup>-6</sup>M) ont été ajoutés à la chambre et les données ont été enregistrées à chaque 30 secondes pendant une période de 6 minutes. La série d'images confocales a été collectée à 18 µm. Entre 35 et 65 sections optiques ont été obtenues dépendant de la surface et de l'adhérence des cellules, avec des images à une résolution de 512 x 512 pixels par balayage. Les images ont été collectées par le logiciel Image Space fourni par Molecular Dynamics et emmagasinées dans la station de travail Silicon Graphics Indy R3000. L'analyse de l'image et la reconstruction en 3D ont été faites à partir de la station de travail Silicon Graphics Indy R4000 utilisant le volume Work tools du logiciel Image Space. Les images ont été imprimées sur une imprimante couleur Mitsubishi CP-210. Le niveau d'intensité du calcium intracellulaire libre est représenté



en pseudo-couleur, l'intensité varie sur une échelle de 0 à 255, l'intensité faible étant représentée par le noir et la forte intensité par le blanc

## 6. Dosage des glycosaminoglycans

La méthode colorimétrique de dosage des glycosaminoglycans a été décrite par FARNDAL *et al.*, (1982). Après avoir été incubées pendant 24 heures dans du DMEM contenant 2 % FBS, les cellules ont été stimulées avec  $10^{-5}$ M de  $\text{PGE}_2$  pendant 24 heures. Par la suite, 50  $\mu\text{l}$  de surnageant ont été prélevés et déposés dans une plaque à 96 puits. Dans chaque puits, 150  $\mu\text{l}$  de colorant 1,9 diméthyl méthylène bleu (1,185g NaCl, 1,52g Glycine, 8mg 1,9 diméthylméthylène, 47,5 ml HCl (0,1M) pour un volume de 1litre) ont été ajoutés. Les résultats ont été lus immédiatement par spectrophotométrie à une longueur d'ondes de 670 nm, comparés à une courbe standard de chondroïtine sulfate et exprimés en  $\mu\text{g}$  de chondroïtine sulfate par mg de protéine. (n=6)

## 7. Dosage des métalloprotéases

Les cellules ont été incubées dans des plaques à 6 puits jusqu'à confluence. Le milieu a été changé et les cellules ont été stimulées avec  $\text{PGE}_2$  ou les agonistes pendant 24 heures. Les surnageants ont été prélevés et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la détermination de l'activité des métalloprotéases. Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) ont été détruits avant la détermination de l'activité des métalloprotéases par réduction et alkylation (DEAN *et al.*, 1984). Brièvement, l'extrait a été incubé à  $37^{\circ}\text{C}$

pendant 30 minutes avec 2 mM de Dithiothréitol, suivit de 5 mM d'iodoacétamine pendant 30 minutes, et de dialyse pendant 18 heures à 4<sup>0</sup> C dans du tampon Tris-HCl (0,05 M Tris-HCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,8). Ce traitement détruit les TIMPs sans détruire l'activité des métalloprotéases (DEAN *et al.*, 1984). Pour chaque échantillon, 0,5 ml de surnageant a été récolté et traité avec 1mM APMA (aminophényl-mercuric acétate) pour activer l'enzyme. Un autre échantillon de 0,5 ml a été prélevé et traité avec 1 mM de 1,10-phénanthroline pour inhiber l'activité de l'enzyme; cet échantillon a été utilisé comme blanc. L'activité des métalloprotéases a été déterminée par la méthode d'Azocoll (CHAVIRA *et al.*, 1984). Un mg d'Azocoll a été ajouté à chaque échantillon et incubé pendant 18 heures à 37<sup>0</sup> C sous agitation. Après décantation des échantillons, l'absorbance de chaque surnageant a été lue à 520 nM. Les résultats sont exprimés en unités d'activité enzymatique par minute par ml. Une unité d'enzyme correspond à la digestion de 1µg/min d'Azocoll à 37<sup>0</sup>C. (DEAN *et al.*, 1989). Un mg/ml d'Azocoll digéré correspond à 0.593 à une longueur d'onde de 520nm (CHAVIRA *et al.* 1984).

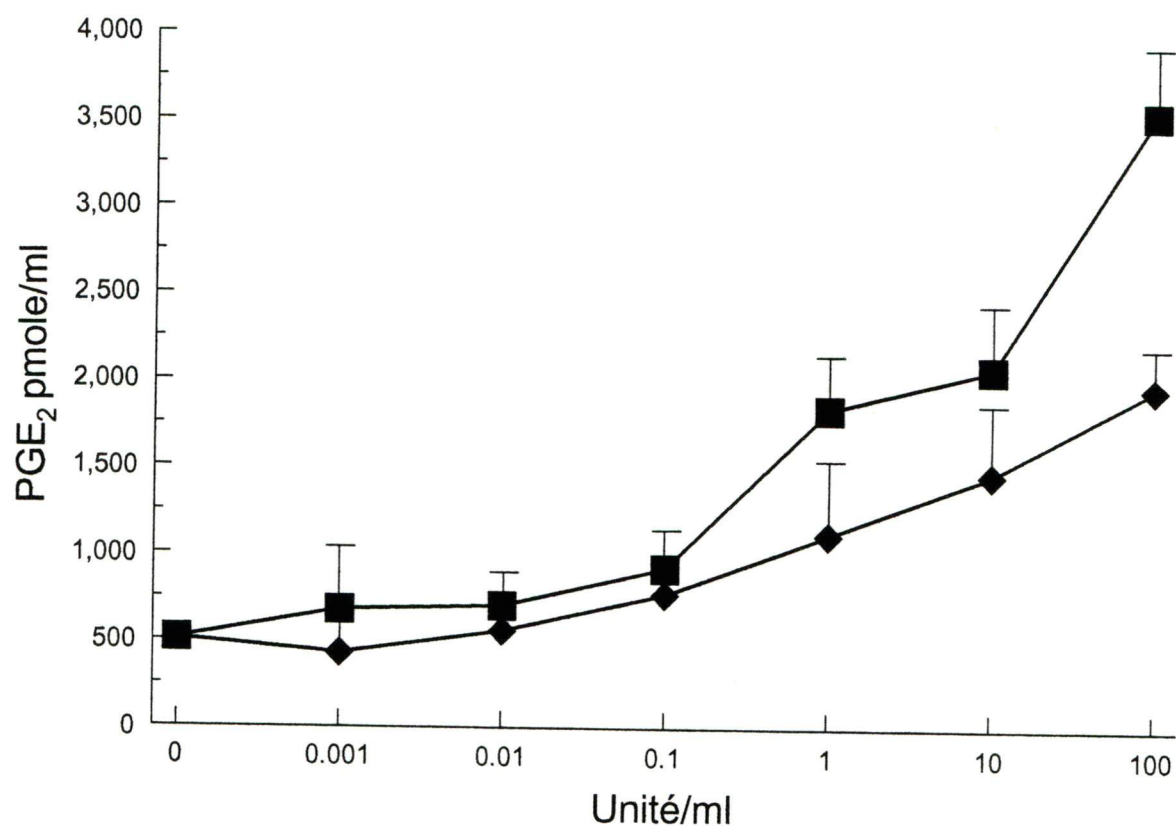
## RÉSULTATS

### 1. Production de Prostaglandines

La première partie du travail consistait à vérifier si les chondrocytes bovins en culture produisaient des prostaglandines après stimulation avec des doses croissantes d'IL-1 et de  $\text{TNF}\alpha$ . Les chondrocytes bovins produisent des prostaglandines suite à la stimulation avec les deux cytokines et cette production est dose-dépendante. Ces résultats sont démontrés à la figure 1.

### 2. Récepteur de prostaglandines

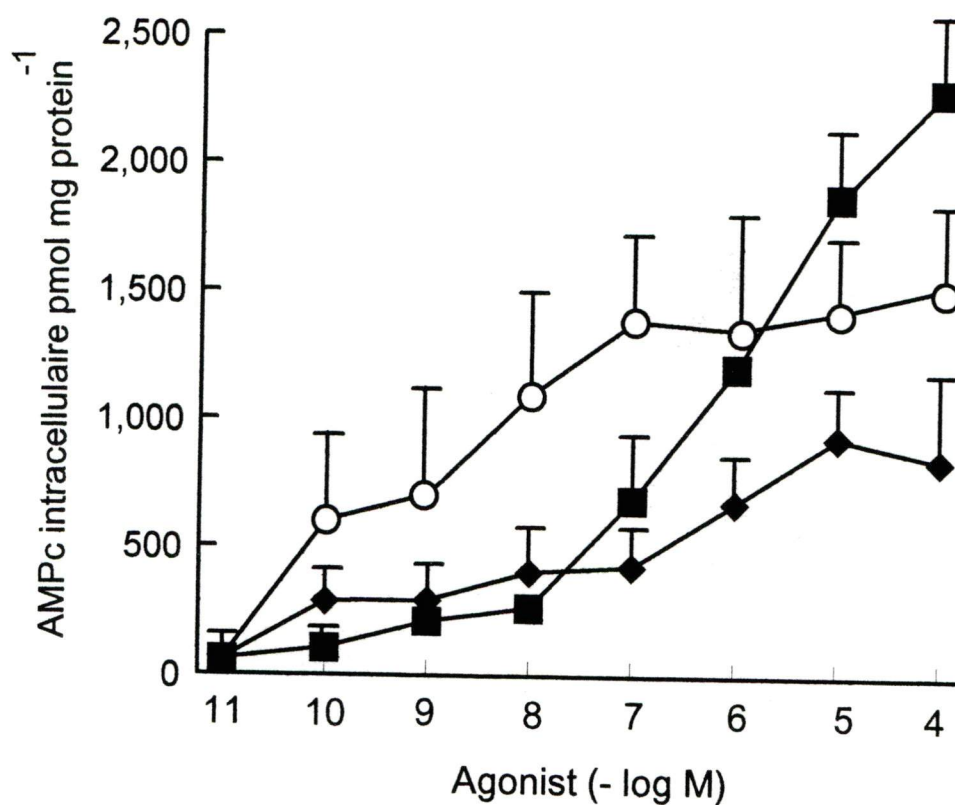
Par la suite nous avons tenté de mettre en évidence la présence de récepteurs aux prostaglandines chez les chondrocytes bovins en culture. Les chondrocytes ont été stimulés avec des doses croissantes de  $\text{PGE}_2$ , ou de Carbaprostacycline, un analogue stable de  $\text{PGI}_2$  et  $\text{PGD}_2$ , pendant une période de 15 minutes en présence d'IBMX, ce qui a causé une augmentation d'AMPc intracellulaire (figure 2). La Carbaprostacycline est le plus puissant agoniste testé ayant un  $\text{EC}_{50} = 1.49 \pm 0.8 \text{ nM}$  ( $n=3$ ), suivit de la  $\text{PGE}_2$  avec un  $\text{EC}_{50} = 55.11 \pm 8.91 \text{ nM}$  ( $n=8$ ) et de la  $\text{PGD}_2$  un  $\text{EC}_{50} = 1654.72 \pm 1119.2 \text{ nM}$  ( $n=4$ ) (Figure 2). La différence entre le  $\text{EC}_{50}$  est statistiquement significative ( $p < 0.05$ ) pour les trois prostaglandines testées.  $\text{PGE}_2$  ( $10^{-5}\text{M}$ ) et Carbaprostacycline ( $10^{-5}\text{M}$ ) ont un effet additif sur la production d'AMPc intracellulaire. (Figure 3). Ces résultats suggèrent fortement que nous sommes en présence de deux récepteurs aux prostaglandines chez les chondrocytes bovins, soit un récepteur à  $\text{PGI}_2$  (IP) et un récepteur à la  $\text{PGE}_2$  (EP).



**Figure 1** Production de prostaglandine E<sub>2</sub> par les chondrocytes bovins en culture.

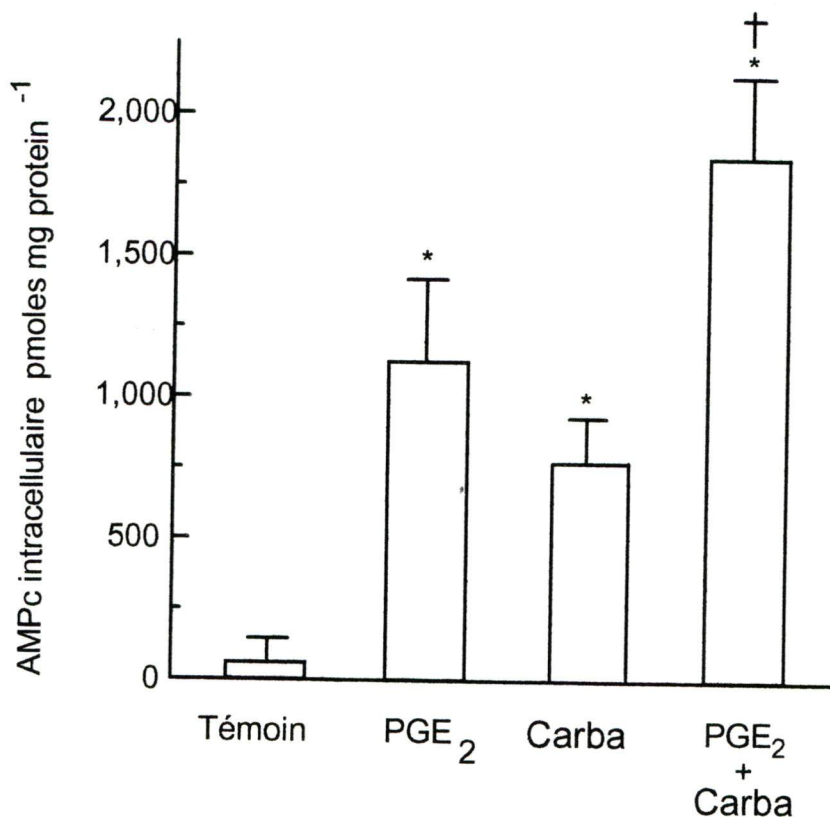
Après une stimulation de 24 heures avec IL-1 (■, n=4) et TNFα (◆, n=4), les chondrocytes produisent de la PGE<sub>2</sub>. Les valeurs représentent la moyenne de quatre résultats expérimentaux ± l'erreur standard de la moyenne des données.





**Figure 2** Production d'AMPc induite par PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> et Carbaprostacycline, chez les chondrocytes bovins en culture.

Après une stimulation de 15 minutes en présence d'IBMX, une augmentation d'AMPc est observée avec PGE<sub>2</sub> ■ (n=8), Carbaprostacycline ○ (n=3), et faiblement par PGD<sub>2</sub> ◆ (n=4). Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois résultats expérimentaux ± la SEM des données.



**Figure 3 Effet de Carbaprostacycline et de PGE<sub>2</sub> sur la production d'AMPc.**

PGE<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> M) et Carbaprostacycline (10<sup>-5</sup> M) produisent une augmentation d'AMPc. Lorsqu'on incube les cellules avec les deux prostaglandines, on observe un effet additif sur la production d'AMPc.

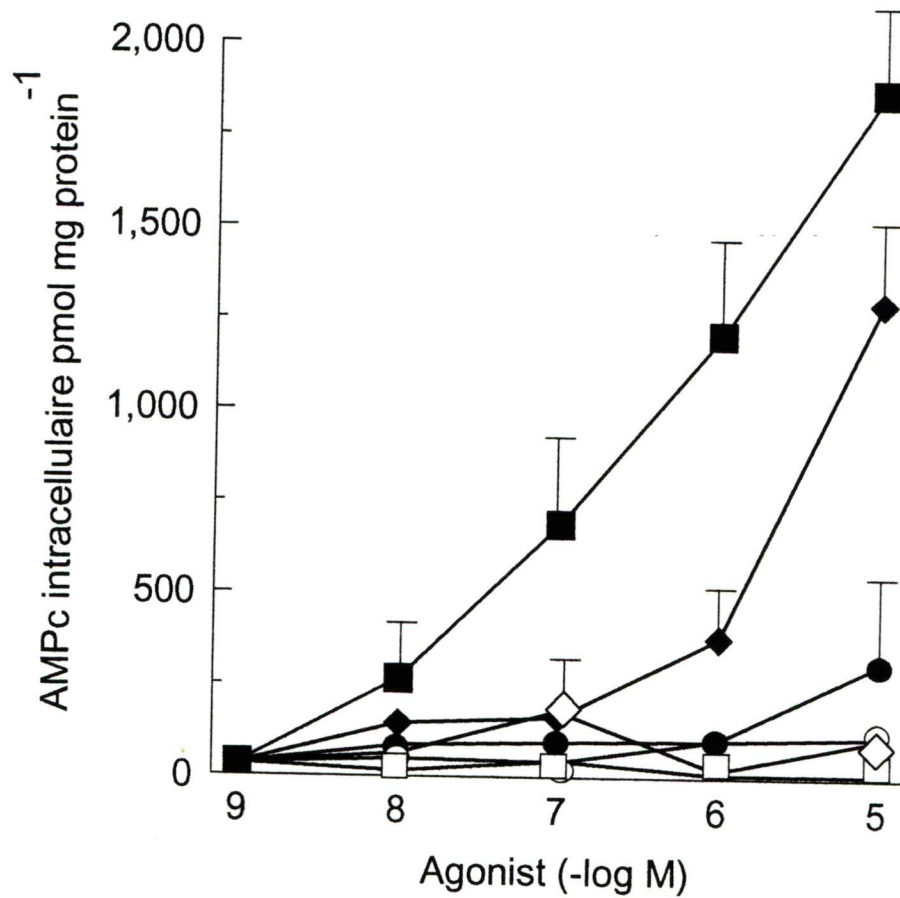
\* p < 0.05 comparé au groupe témoin, † p < 0.05 comparé à PGE<sub>2</sub> et Carbaprostacycline seul. Carba = Carbaprostacycline. (PGE<sub>2</sub> n=3, Carbaprostacycline n=6, PGE<sub>2</sub> et Carbaprostacycline n=3) Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois résultats expérimentaux ± la SEM des données.

## 2.1 Sous-type EP<sub>2</sub>

Afin de déterminer le sous-type de récepteur des prostaglandines E<sub>2</sub> chez les chondrocytes bovins en culture nous avons utilisé des agonistes spécifiques aux sous-types de récepteurs (Figure 4). Après stimulation pendant 15 minutes avec les agoniste PGE<sub>2</sub> et 11-déoxy-PGE<sub>1</sub> (agoniste EP<sub>2</sub>,EP<sub>4</sub>), en présence d'IBMX, la production d'AMPc intracellulaire a été augmentée, tandis que le de Butaprost (agoniste EP<sub>2</sub>), n'a pas eu d'effet sauf à une forte concentration, soit 10<sup>-5</sup>M. Le 17-phényl-ω-trinor-PGE<sub>2</sub> (agoniste EP<sub>1</sub>), le Sulprostone (agoniste EP<sub>3</sub>/EP<sub>1</sub>) et le MB 28767 (agoniste EP<sub>3</sub>) n'ont eu aucun effet sur la production d'AMPc. Les résultats suggèrent la présence d'un récepteur de sous-type EP<sub>4</sub> car le Butaprost, qui est agoniste EP<sub>2</sub> spécifique, n'a pas eu d'effet sur la production d'AMPc.

## 2.2 Sous-type EP<sub>3</sub>

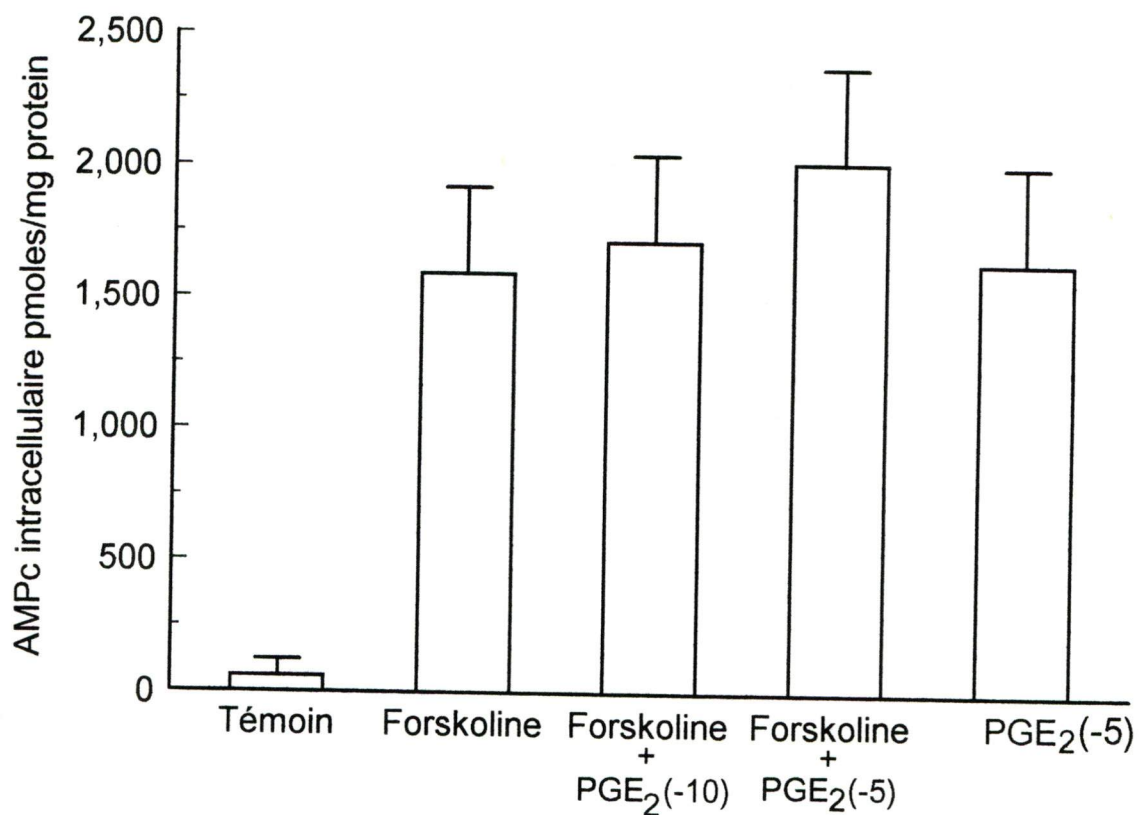
Les récepteurs de type EP<sub>3</sub> peuvent être couplés à l'adénylate cyclase par une protéine Gi, de sorte que son activation peut entraîner une diminution de l'activité de cette enzyme . Afin de déterminer si le récepteur EP<sub>3</sub> était présent dans notre préparation, les cellules ont été incubées en présence de 10μM de Forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase et par la suite stimulées avec PGE<sub>2</sub> à des concentrations de 10<sup>-10</sup> M et de 10<sup>-5</sup> M, pendant une période de 15 minutes (Figure 5). Aucune inhibition de la production d'AMPc induite par la forskoline n'a été observée en présence



**Figure 4 Production d'AMPc par les agonistes à la PGE<sub>2</sub> chez les chondrocytes bovins en culture.**

PGE<sub>2</sub> ■ (n=8), 11-déoxy-PGE<sub>1</sub> ◆ (n=3), 17-phényl-ω-trinor-PGE<sub>2</sub> ◇ (n=3), Butaprost ● (n=3), Sulprostone □ (n=3), MB 28 767 ○ (n=3). Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois résultats expérimentaux ± la SEM des données.

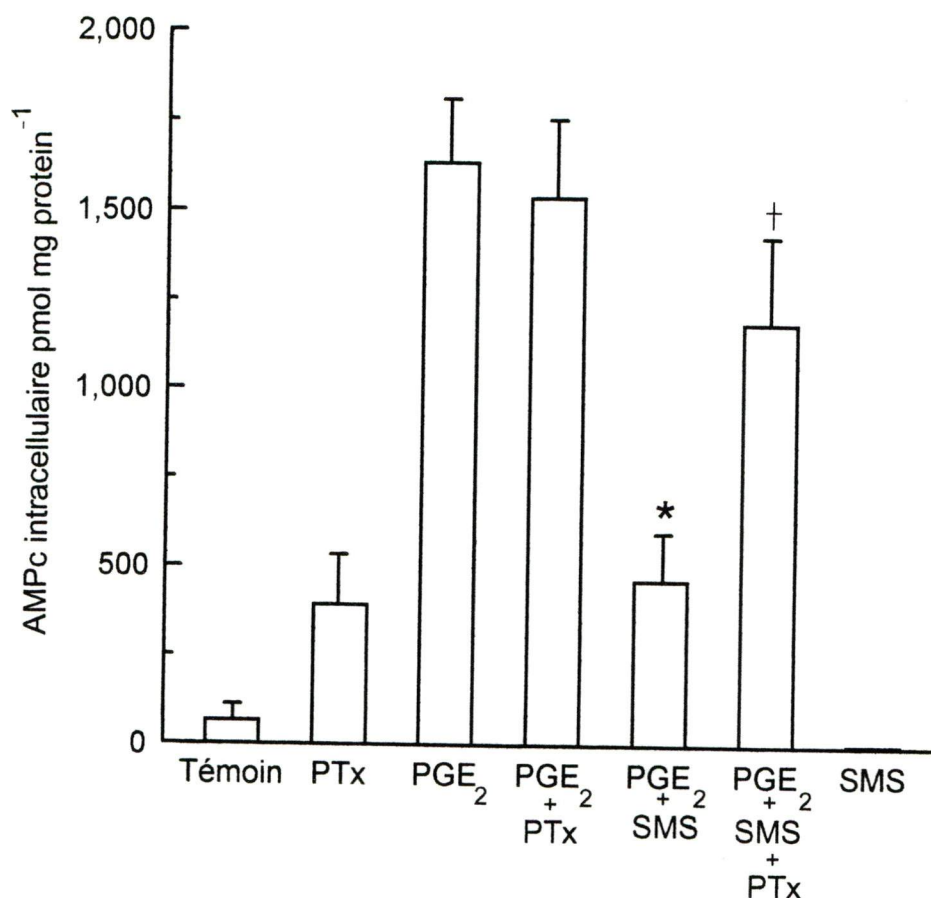




**Figure 5 Inhibition de la production d'AMPc induite par PGE<sub>2</sub> après stimulation avec Forskoline**

Forskoline 10  $\mu$ M (n=3), Forskoline 10  $\mu$ M + PGE<sub>2</sub> 10<sup>-10</sup>M (n=3), Forskoline 10  $\mu$ M + PGE<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup>M (n=3). Témoin, cellules non-stimulées (n=3). Les valeurs représentent la moyenne de trois résultats  $\pm$  la SEM des données.

de PGE<sub>2</sub>. Ces résultats suggèrent que le sous-type EP<sub>3</sub> n'est pas présent chez les chondrocytes bovins en culture. Puisque l'effet prédominant de la PGE<sub>2</sub> sur les chondrocytes en culture est d'augmenter l'AMPc intracellulaire, cela pourrait masquer un petit nombre de récepteurs couplés à une protéine G<sub>i</sub> sans qu'une inhibition par la PGE<sub>2</sub> puisse être observable après stimulation avec PGE<sub>2</sub> et Forskoline. Pour tester cette hypothèse nous avons vérifié l'effet de la toxine pertussis, qui inhibe les protéines G<sub>i</sub>, sur la réponse à la PGE<sub>2</sub>. Si des récepteurs couplés à une protéine G<sub>i</sub> sont présents on s'attend à une réponse augmentée en présence de la toxine. Les cellules ont été pré-incubées en présence de toxine pertussis à une concentration de 10 ng/ml pendant 12 heures, et par la suite stimulées avec 10<sup>-5</sup> M de PGE<sub>2</sub> pendant 15 minutes. Comme le montre la figure 6, le traitement à la Ptx n'a pas changé la réponse à la PGE<sub>2</sub>, ce qui nous indique que les chondrocytes bovins ne possèdent pas de récepteur à la PGE<sub>2</sub> couplé à une protéine G<sub>i</sub>. Comme témoin nous avons utilisé le composé SMS 201-995 (10<sup>-7</sup>M), un analogue stable de la somatostatine, hormone connue pour activer des récepteurs couplés à la protéine G<sub>i</sub> (VIOLLET *et al.*, 1995). Le composé SMS 201-995 a été capable d'inhiber le niveau basal d'AMPc intracellulaire et la réponse à la PGE<sub>2</sub>, l'ajout de Ptx à la préparation a renversé l'effet inhibiteur du composé SMS 201-995 sur la réponse à la PGE<sub>2</sub> (Figure 6). Ces résultats montrent qu'un récepteur couplé à une protéine G<sub>i</sub> serait détectable par le système, suggérant donc fortement l'inexistence d'un récepteur à la PGE<sub>2</sub> avec activité inhibitrice sur l'adénylate cyclase.



**Figure 6** Effet de la toxine Pertussis sur la production d'AMPc induite par la PGE<sub>2</sub>

Toxine pertussis 10 ng/ml (Ptx) (n=3), PGE<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup>M (n=3), PGE<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup>M + Ptx (n=3), PGE<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup>M + SMS 201- 995 10<sup>-7</sup>M (n=3), PGE<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup>M + SMS 201- 995 10<sup>-7</sup>M + Ptx (n=3), SMS 201-995 10<sup>-7</sup>M (n=3), témoin= cellules non stimulées (n=3). Les valeurs représentent la moyenne de trois résultats expérimentaux ± la SEM des données. \* p < 0.05, Student's t test, comparé à PGE<sub>2</sub> seule, + p < 0.05 comparé à PGE<sub>2</sub> + SMS 201- 995. SMS= SMS 201- 995

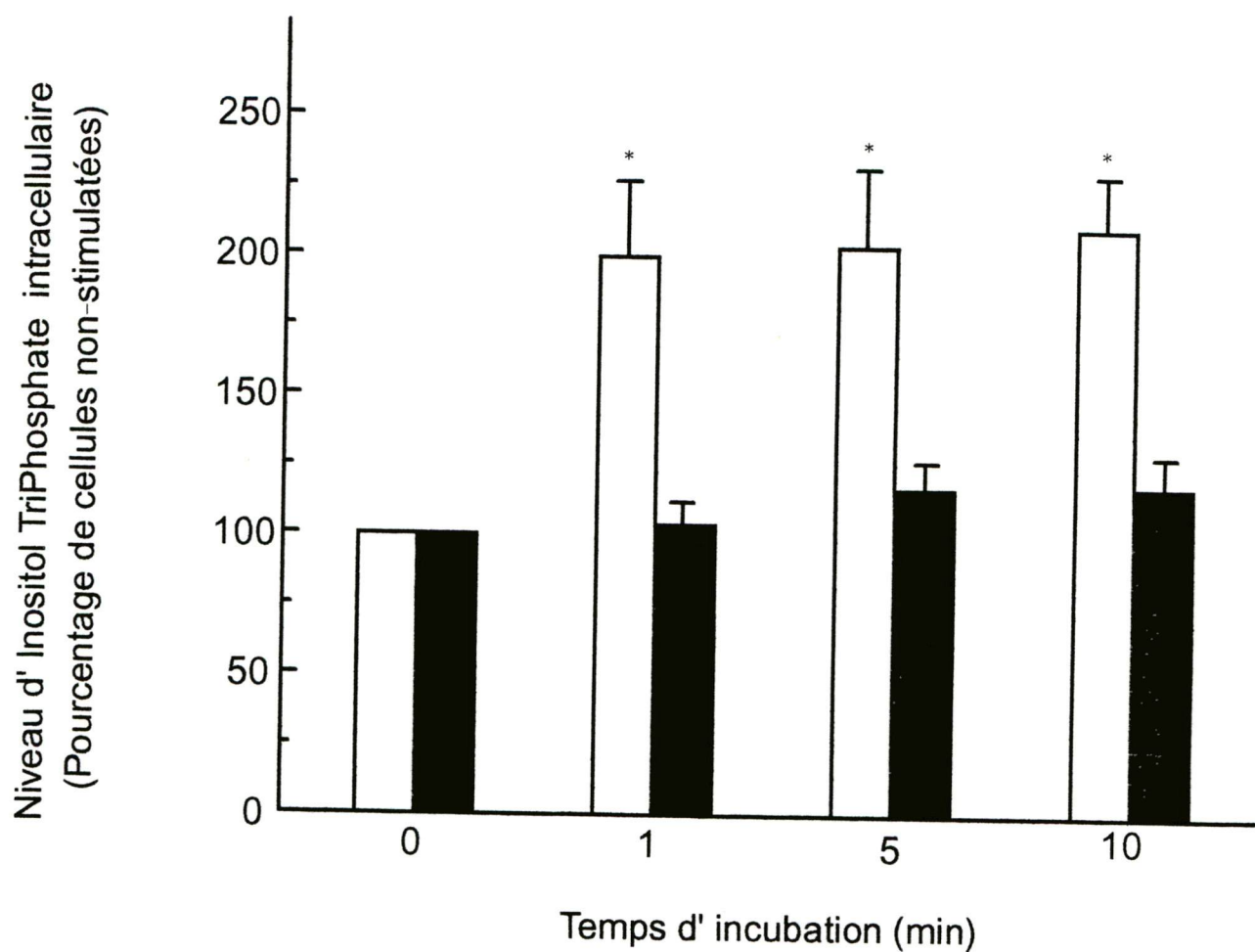
### 2.3 Sous-type EP<sub>1</sub>

Afin de déterminer si les chondrocytes bovins possèdent un récepteur de sous-type EP<sub>1</sub>, les cellules ont été stimulées avec une concentration de  $10^{-5}$  M de PGE<sub>2</sub> pendant des périodes de 1, 2, 10 minutes et le niveau d'IP<sub>3</sub> intracellulaire a été déterminé par chromatographie. La figure 7 montre aucune augmentation d'IP<sub>3</sub> contrairement à la Bradykinine qui augmente la production d'IP<sub>3</sub>. La Bradykinine servait de contrôle positif. Ce résultat suggère que les chondrocytes bovins ne possèdent pas de récepteurs de sous-types EP<sub>1</sub>. Puisqu'il a été suggéré dans la littérature que certains récepteurs à la PGE<sub>2</sub> pourraient augmenter le calcium intracellulaire par d'autres voies que l'IP<sub>3</sub>, nous avons déterminé la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> à l'aide de la microscopie confocale. La figure 8 montre que la PGE<sub>2</sub> et la Carbaprostacycline à des concentrations de  $10^{-5}$  M n'induisent pas d'augmentation de calcium intracellulaire, tandis qu'en présence de Bradykinine une augmentation de calcium est observée. Ces résultats appuient l'hypothèse que les chondrocytes bovins en culture n'expriment pas de récepteur EP<sub>1</sub>, ni de récepteur à la Carbaprostacycline couplé à l'augmentation de calcium.

### 2.4 Sous-type EP<sub>4</sub>

Des études ont été faites en présence d'un antagoniste spécifique pour le sous-type EP<sub>4</sub> soit le AH 23 848B. Des courbes doses-réponses ont été faites en présence de PGE<sub>2</sub> et de l'antagoniste AH 23 848B et la production d'AMPc a été mesurée. En présence de AH 23 848B à une concentration de 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M et 30  $\mu$ M la courbe





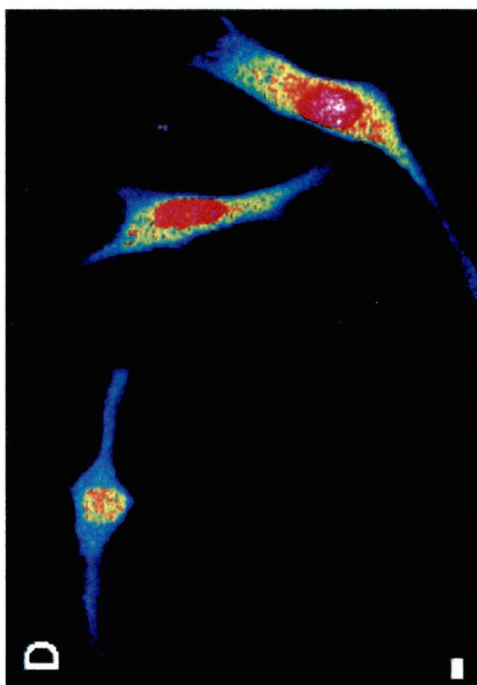
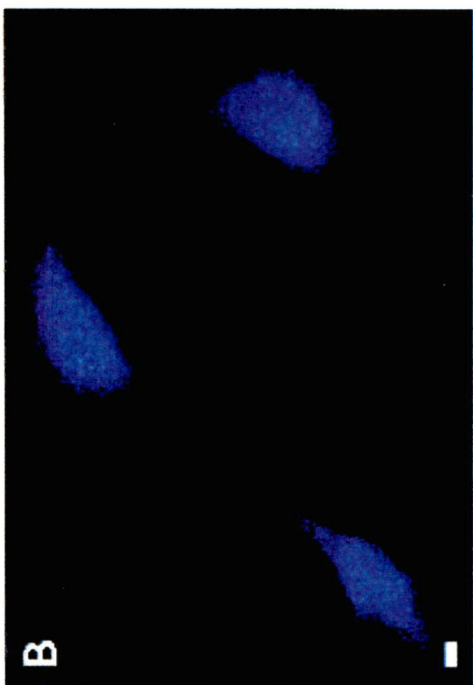
**Figure 7 Production d'IP<sub>3</sub> intracellulaire déterminé par chromatographie chez les chondrocytes bovins en culture.**

PGE<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup> M (colonnes fermées, n=3), Bradykinine 10<sup>-6</sup> (colonnes ouvertes, n=3), contrôle, cellules non stimulées. (n=3). Les valeurs représentent la moyenne de trois résultats expérimentaux ± la SEM des données.

\* P < 0.05 comparé au temps zéro.

**Figure 8 Augmentation de calcium intracellulaire par microscopie confocale chez les chondrocytes bovins en culture.**

Les chondrocytes bovins ont été stimulé avec  $\text{PGE}_2$   $10^{-5}\text{M}$ , Carbaprostacycline  $10^{-5}\text{M}$ , Bradykinine  $10^{-6}\text{M}$ , le témoin représente des cellules non-stimulées. A= témoin, B= Carbaprostacycline, C=  $\text{PGE}_2$ , D= Bradykinine. La pseudocouleur représente la concentration de calcium intracellulaire, blanc > rouge > jaune > bleu > noir, Le noir correspond à une absence de calcium et le blanc à une quantité maximum de calcium. Les résultats représentent une expérience représentative de trois expériences. Barre =  $5\mu\text{m}$ .



de production d'AMPc produite par PGE<sub>2</sub> est déplacée vers la droite (Figure 9). Dans des conditions semblables, le composé AH 23 848B n'a pas déplacé la courbe dose-réponse à la Carbaprostacycline (Figure 10). Ces résultats nous indiquent que le AH 23 848B antagonise de façon spécifique la réponse produite par PGE<sub>2</sub>, démontrant donc la présence d'un récepteur de sous-type EP<sub>4</sub> chez les chondrocytes bovins en cultures. La régression de Schild donne une pente de  $0.43 \pm 0.07$ .

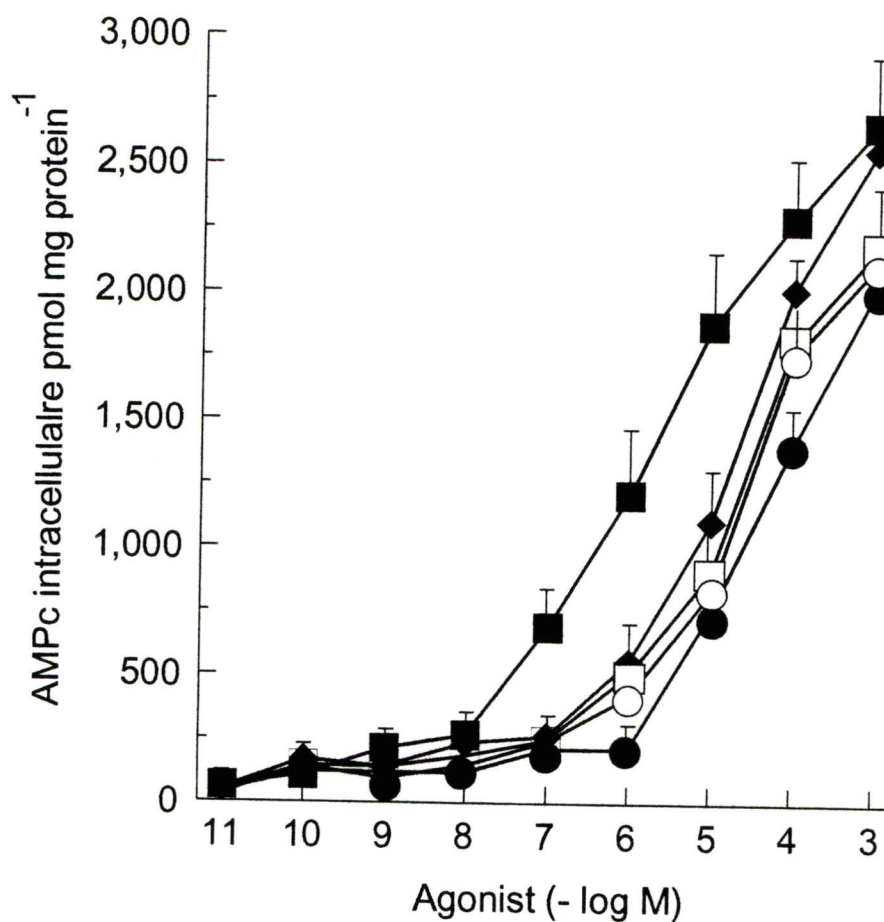
### **3. Effet des PGE<sub>2</sub> sur les Glycosaminoglycans**

Après une stimulation de 24 heures la PGE<sub>2</sub>, à une concentration de  $10^{-5}$ M, n'a pas eu d'effet significatif sur la libération de glycosaminoglycans à l'aide de la méthode colorimétrique, (figure 11).

### **4. Effet des PGE<sub>2</sub> sur la production des métalloprotéases**

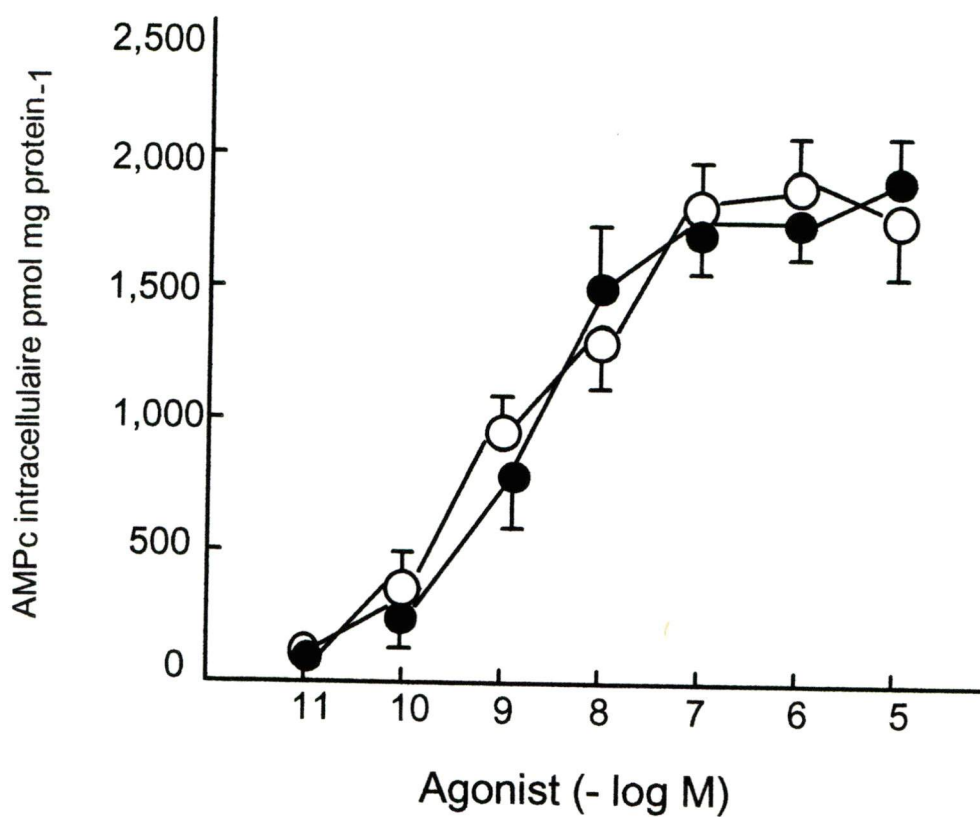
PGE<sub>2</sub> à une dose de  $10^{-5}$  M augmente le niveau basal de métalloprotéases et l'effet est inhibé par l'antagoniste AH 23 848B à une concentration de 30  $\mu$ M. Le 11-deoxy PGE<sub>1</sub> à  $10^{-5}$  M a également augmenté la production de métalloprotéases. Par contre le 17-phenyl- $\omega$ -PGE<sub>2</sub> et le Sulprostone n'ont eu aucun effet significatif. La forskoline (10  $\mu$ M), qui est un activateur de l'adénylate cyclase et l'IBMX, qui est un inhibiteur de la phosphodiesterase ont également été capables d'augmenter la production de métalloprotéases. (figure 12).





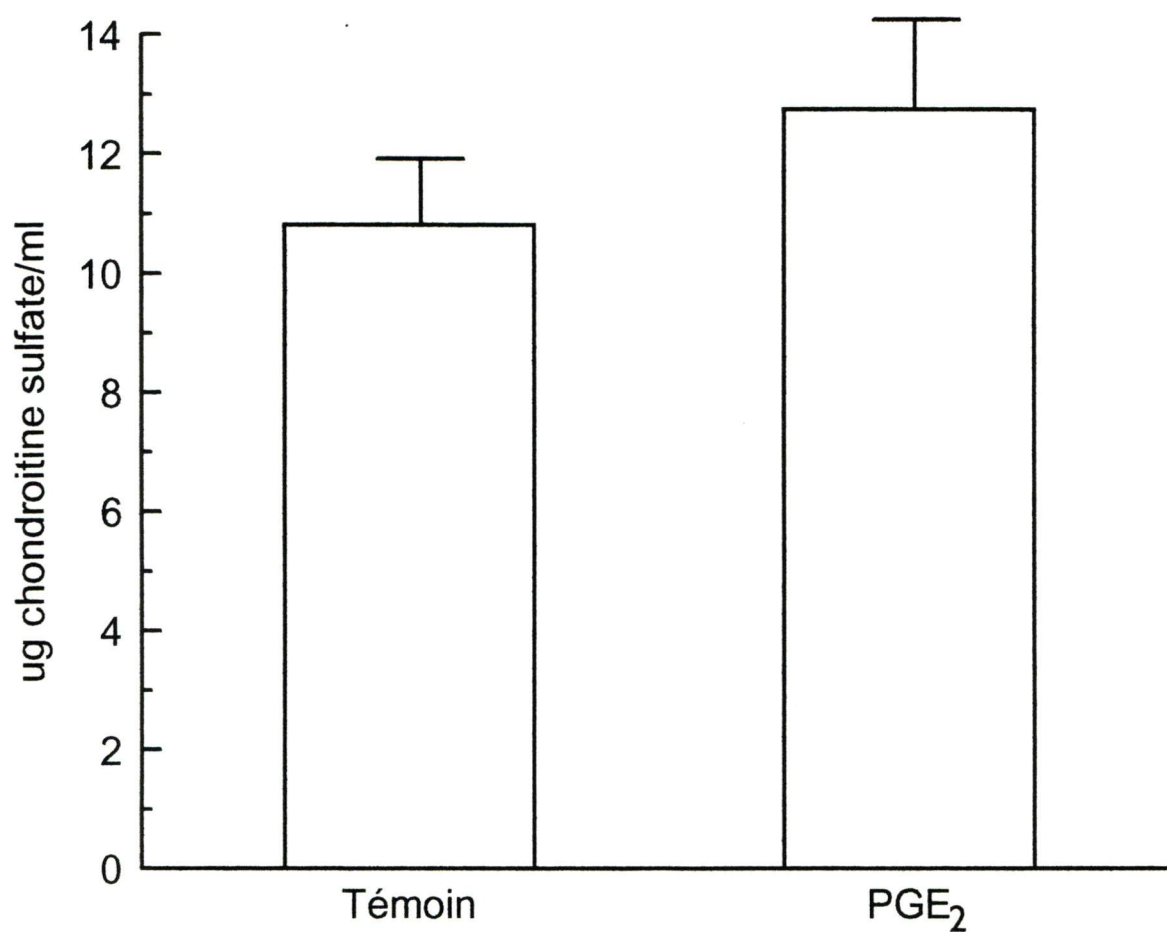
**Figure 9 Inhibition d'AMPc par l'antagoniste AH 23 848B chez les chondrocytes bovins en culture.**

PGE<sub>2</sub> ■ (n=8), PGE<sub>2</sub> + AH 23 848 1 μM ◆ (n=3), PGE<sub>2</sub> + 3 μM □ (n=3), PGE<sub>2</sub> + 10 μM ○ (n=3), PGE<sub>2</sub> + 30 μM ● (n=6). Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois résultats expérimentaux ± la SEM des données.



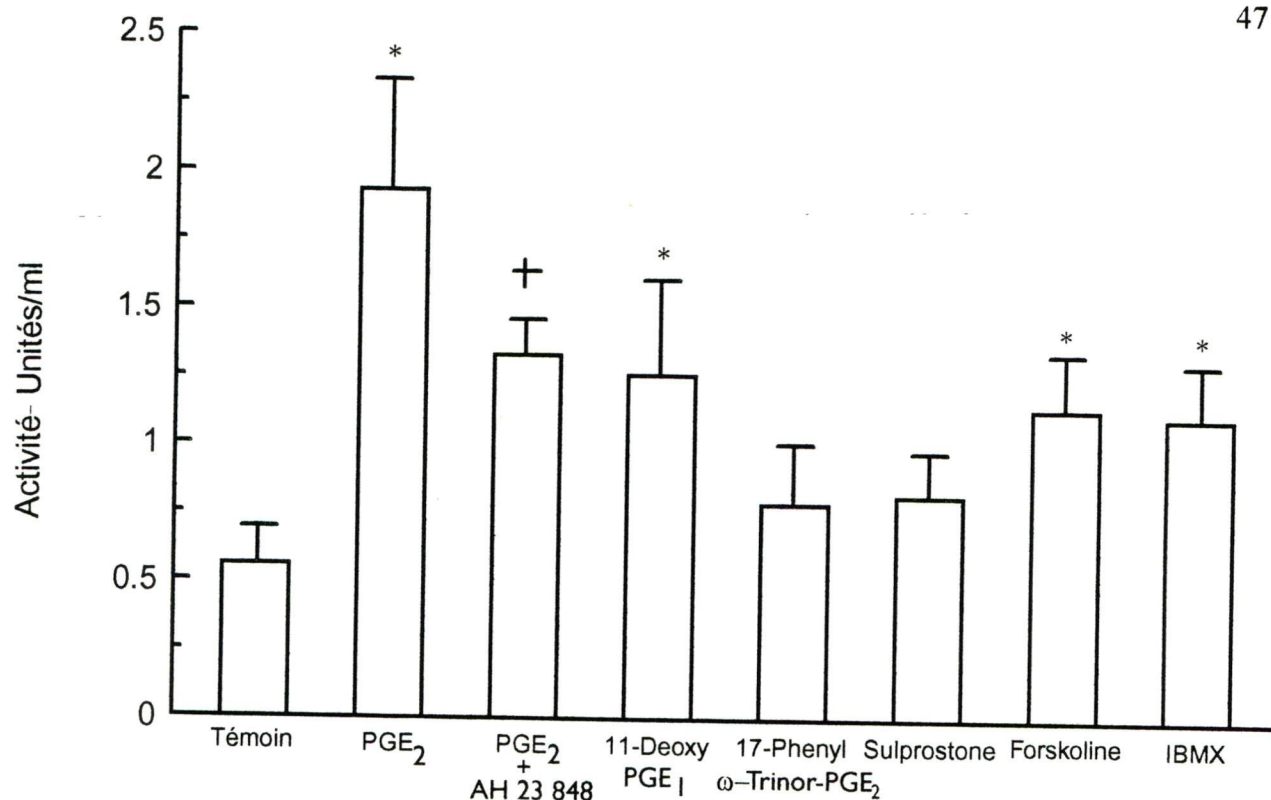
**Figure 10** Effet de l'antagoniste AH 23 848 sur la production d'AMPc produite par la carbaprostacycline.

Carbaprostacycline O (n=3), Carbaprostacycline + AH 23 848B 30 μM (● n=3). Les valeurs représentent la moyenne de trois résultats expérimentaux ± la SEM des données.



**Figure 11 Production de glycosaminoglycans par les chondrocytes bovins en culture.**

PGE<sub>2</sub> ( $10^{-5}$ M). Témoin représente des cellules non-stimulées. Les valeurs représentent la moyenne de six résultats expérimentaux  $\pm$  la SEM des données.



**Figure 12. Activité de métalloprotéases par les chondrocytes bovins en culture.**

Les chondrocytes bovins ont été stimulés avec PGE<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup>M (n=14), PGE<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup>M + AH 23 848B 30 μM (n=10), 11-deoxy-PGE<sub>1</sub> 10<sup>-5</sup>M (n=6), 17-Phenyl-ω-trinor-PGE<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup>M (n=6) Sulprostone 10<sup>-5</sup>M (n=6), Forskoline 10 μM (n=4) et l'IBMX 0.1 mM (n=4). Le témoin représente des cellules non-stimulées (n=14). Les valeurs représentent la d'au moins quatre résultats expérimentaux ± la sem des données.



## DISCUSSION

Les prostaglandines peuvent jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme du cartilage. Elles sont produites par les chondrocytes stimulés par certaines cytokines, telles que l'IL-1 et le  $\text{TNF}\alpha$ , et peuvent reproduire certains effets de ces cytokines, tel que suggéré par des études démontrant que les anti-inflammatoires peuvent changer la réponse des chondrocytes à ces cytokines et qu'une partie des effets des AINS peut être contrée par la  $\text{PGE}_2$  exogène (PELLETIER *et al.*, 1989). L'interprétation de ces études pose, cependant, certains problèmes. Entre autres le fait que les AINS, en inhibant la cyclooxygénase, bloqueront la synthèse de tous les prostanoïdes. Il a aussi été montré que les AINS peuvent influencer d'autres systèmes enzymatiques que la cyclooxygénase (LAEKMAN *et al.*, 1979; ROBINSON *et al.*, 1986). La caractérisation des types et des sous-types de récepteurs aux prostaglandines pourrait donc avoir deux implications majeures. Elle nous permettrait, d'abord, de mieux connaître le rôle physiologique des prostaglandines sur le cartilage en inhibant ou en activant spécifiquement des récepteurs. Elle pourrait aussi permettre une approche pharmacologique innovatrice des maladies inflammatoires et dégénératives articulaires. Ainsi, l'utilisation des agonistes ou des antagonistes spécifiques permettrait de cibler les récepteurs présents dans les chondrocytes sans toucher à ceux dans les reins et l'estomac.

Pour la présente étude nous avons choisi de travailler avec des cultures primaires de chondrocytes bovins pour des raisons techniques. Les chondrocytes humains seraient sûrement plus intéressants, mais des problèmes techniques se présentent. Les chondrocytes articulaires humains peuvent être obtenus à partir de cadavres ou d'échantillons chirurgicaux prélevés lors de l'implantation d'une prothèse. Dans ce dernier cas, la raison de la prothèse étant justement la destruction du cartilage articulaire, très peu de tissu peut être prélevé. Le prélèvement à partir des cadavres présente des

problèmes d'ordre légal qui commencent à peine à être réglées. Nous avons donc choisi le cartilage bovin puisqu'il s'agit d'un grand mammifère dont les différences avec le cartilage articulaire humain sont moindres que celles rencontrées chez les petits rongeurs.

Nous avons initialement voulu confirmer, chez les chondrocytes bovins en culture, l'effet stimulateur de l'IL-1 et du  $\text{TNF}\alpha$  sur la production des prostaglandines. Nos résultats montrent que ces deux cytokines ont un effet stimulateur sur la synthèse de  $\text{PGE}_2$ , et que cet effet est dose-dépendant. Ces résultats confirment ceux déjà publiés par d'autres auteurs chez des chondrocytes de différentes espèces (GILMAN 1987, CHIN *et al.*, 1988, BUNNING *et al.*, 1989).

Notre objectif étant la caractérisation des types et des sous-types de récepteurs aux PGs présents dans des chondrocytes articulaires en culture primaire, notre première approche consistait à faire des études de liaison en utilisant de la  $\text{PGE}_2$  marquée au tritium, à l'exemple de ce que nous avons déjà fait avec les récepteurs aux leucotriènes chez les cellules HL-60 (PATRY *et al.*, 1996). Malgré les différentes conditions étudiées, soit la température, le pH, le tampon, le temps d'incubation et la quantité de cellules, nous n'avons pas été capables d'obtenir une quantité de liaison spécifique capable de nous permettre la caractérisation du système. En effet, cela semble être plutôt la règle à juger par la littérature, où tous les articles publiés qui ont caractérisé des récepteurs aux prostaglandines à l'aide des études de liaison ont utilisé de cellules transfectées avec les récepteurs recombinants (BASTIEN *et al.*, 1994; ADAM *et al.*, 1994), donc possédant une très forte quantité de récepteurs, ou des tissus qui expriment ces récepteurs en quantité très élevée, tel que l'utérus (KENNEDY *et al.*, 1986, MOLNAR *et al.*, 1990). Nous pensons aujourd'hui que la très faible liaison spécifique à la  $\text{PGE}_2$  que nous avons retrouvée dans nos études préliminaires est due à un ensemble de plusieurs facteurs, dont les plus importants seraient la faible quantité de récepteurs sur la surface cellulaire, la faible affinité de ces récepteurs et la radioactivité spécifique insuffisante du ligand tritié.



Dans la littérature, les études de caractérisation des récepteurs aux prostaglandines ont été faits par pharmacologie classique, dans des bains à organes isolés. Comme il s'agit-là d'une technique impossible à utiliser avec des cellules en culture, il a fallu se tourner vers une autre méthode. Nous avons donc choisi de stimuler les cellules avec les prostaglandines naturelles et leurs analogues et d'en déterminer l'effet sur les second messagers connus, soit l'AMPc, l'IP<sub>3</sub> et le calcium intracellulaire. PGE<sub>2</sub>, Carbaprostacycline, un analogue stable de PGI<sub>2</sub> (WHITTLE *et al.*, 1980; AIKEN *et al.*, 1980) et PGD<sub>2</sub> augmentent significativement et de façon dose-dépendante, le niveau d'AMPc intracellulaire des chondrocytes bovins en culture. L'ordre de puissance de ces trois substances est la suivante: Carbaprostacycline > PGE<sub>2</sub> >> PGD<sub>2</sub>. La réponse évoquée par PGD<sub>2</sub> est détectable seulement à de fortes concentrations (10<sup>-6</sup>M), ce qui suggère une interaction non-spécifique avec le récepteur EP ou IP. En combinant PGE<sub>2</sub> et Carbaprostacycline à des doses capables d'induire une réponse maximale (10<sup>-5</sup>M), on observe un effet additif dans la production d'AMPc. Ces résultats suggèrent fortement l'existence de deux populations distinctes de récepteurs, l'un sensible à la Carbaprostacycline, donc du type IP, l'autre sensible à la PGE<sub>2</sub>, donc du type EP. La présence d'un récepteur du type IP est confirmée par le fait que l'antagoniste AH23848B déplace la courbe dose-réponse à la PGE<sub>2</sub> vers la droite sans affecter celle à la Carbaprostacycline. Nous pouvons donc affirmer que, chez les chondrocytes bovins, il y a expression d'un récepteur IP lié à l'augmentation d'AMPc, ainsi que d'un récepteur du type EP dont la détermination du sous-type constituait la prochaine étape à franchir.

Le sous-type EP<sub>1</sub> est couplé à l'augmentation de calcium intracellulaire (FUNK *et al.*, 1993) et dans certains modèles, à une augmentation du *turnover* des inositol-phosphates. Chez les chondrocytes bovins, cependant, PGE<sub>2</sub> n'a pas causé aucune augmentation du calcium intracellulaire ni de l'inositol triphosphate intracellulaire. Dans le même système, la bradykinine s'est avérée capable d'augmenter les deux paramètres. Ces résultats suggèrent fortement que le sous-type EP<sub>1</sub> n'est pas présent

chez les chondrocytes bovins en culture ou s'il l'est, il se trouve découplé de ces mécanismes habituels de transduction du message, étant donc dépourvu d'importance physiologique dans la préparation. Le même raisonnement s'applique à un éventuel récepteur EP<sub>3</sub> couplé soit à l'activation de la phospholipase C, soit à un canal calcique.

Des mesures d'AMPc ont été effectuées après stimulation avec PGE<sub>2</sub> et des agonistes spécifiques à chaque sous-type dans le but de vérifier si le sous-type EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub> ou un sous-type EP<sub>3</sub> couplé à une protéine G<sub>s</sub> étaient présents chez les chondrocytes bovins. Le composé 11-deoxy PGE<sub>1</sub>, qui est un agoniste EP<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub>, augmente la production d'AMPc à un niveau moindre que la PGE<sub>2</sub>. Cependant le Butaprost, qui est un agoniste sélectif au récepteur EP<sub>2</sub> (GARDINER *et al.*, 1986) n'a eu qu'un faible effet sur l'augmentation d'AMPc, et ce à une concentration aussi élevée que 10<sup>-5</sup>M. Dans la littérature, des résultats contradictoires ont été obtenus avec le Butaprost. Dans la veine jugulaire de lapin, le Butaprost est moins puissant que dans une préparation de trachée de chat (LAWRENCE *et al.*, 1992a), ce qui suggère qu'il existe deux sous-types de récepteur EP<sub>2</sub>, un premier sous-type très sensible au Butaprost et un deuxième sous-type relativement insensible au Butaprost. Des résultats contradictoires avec le Butaprost ont aussi été obtenus par des essais de liaison sur des récepteurs recombinants. Le Butaprost n'interagit pas avec les récepteurs recombinants EP<sub>2</sub> humain et de la souris clonés par BASTIEN *et al.* (1994) et HONDA *et al.* (1993), tandis qu'il interagit avec le clone EP<sub>2</sub> de REGAN *et al.* (1994). Sur le système de la souris il a été montré, à l'aide du composé AH 23848B, que les deux premiers récepteurs clonés sont du sous-type EP<sub>4</sub> et non pas EP<sub>2</sub>, et que le Butaprost est un agoniste EP<sub>2</sub> mais non pas EP<sub>4</sub> (NISHIGAKI *et al.*, 1995). La caractérisation des sous-type EP<sub>2</sub> et EP<sub>4</sub> peut donc se faire à l'aide de ces deux composés, le Butaprost, agoniste sélectif au récepteur EP<sub>2</sub> et le AH 23 848B antagoniste sélectif au récepteur EP<sub>4</sub>.

Nos résultats avec les chondrocytes bovins montrent une augmentation de l'AMPc intracellulaire suite à la stimulation avec PGE<sub>2</sub> et 11 déoxy-PGE<sub>1</sub> (un agoniste



EP<sub>2</sub> et EP<sub>4</sub>)(NISHIGAKI *et al.*, 1995), dans cette ordre de puissance, le butaprost étant un très faible agoniste. Ces résultats suggèrent déjà l'existence d'un récepteur du sous-type EP<sub>4</sub>. Pour confirmer cette hypothèse nous avons vérifié l'effet du composé AH 23 848B, un antagoniste EP<sub>4</sub>, sur la réponse induite par la PGE<sub>2</sub>. Les résultats nous montrent que ce composé est capable de déplacer à droite de façon spécifique la courbe dose-réponse à la PGE<sub>2</sub>, confirmant ainsi qu'il s'agit d'un récepteur de sous-type EP<sub>4</sub>.

Le récepteur EP<sub>4</sub> a été caractérisé initialement sur la veine saphène de porcelet à l'aide du composé AH 23 848B, et l'antagoniste a été décrit comme compétitif (COLEMAN *et al.*, 1994 a). Nous avons donc testé l'effet de différentes concentrations de AH 23 848B afin de déterminer s'il s'agit d'un antagoniste compétitif ou non-compétitif. On note que l'incubation avec l'antagoniste cause une discrète diminution de la réponse maximale à la PGE<sub>2</sub> et que la régression de Schild donne une pente différente de l'unité. Ces résultats suggèrent un antagonisme non-compétitif, mais d'autres éléments peuvent causer des résultats semblables et doivent être considérés dans l'analyse de nos données. Ainsi, le métabolisme des composés dans la préparations, les déterminations en situation de non-équilibre et l'existence d'une population hétérogène de récepteurs peuvent être à l'origine d'une régression de Schild différente de l'unité (KENAKIN, 1987). Dans notre préparation la dernière possibilité est à considérer, puisqu'à des concentrations élevées de PGE<sub>2</sub> une interaction avec le récepteur IP est possible et même probable. Il serait donc intéressant de reprendre cette étude en présence d'un antagoniste IP, mais ce composé, malheureusement, n'existe pas. Dernièrement dans la littérature, il a été reporté que chez les cellules Jurkat (DE VRIES *et al.*, 1995), le AH 23 848B est un antagoniste non-compétitif. Les auteurs suggèrent un nouveau récepteur EP ou un sous-sous-type de récepteur EP<sub>4</sub>. Il faudrait signaler, cependant, que chez les cellules Jurkat il n'y a pas de récepteur IP, ce qui simplifie l'analyse des résultats. Dans notre système il est impossible, avec les outils pharmacologiques actuellement disponibles, de conclure quant à la nature exacte de l'antagonisme du composé AH 23 848B. Nous pouvons donc

affirmer que le récepteur EP présent chez les chondrocytes bovins en culture présente plusieurs caractéristiques pharmacologiques d'un récepteur EP<sub>4</sub> sans pouvoir conclure de façon définitive pour cette classification.

Nous avons également voulu savoir si les chondrocytes bovins en culture possèdent des récepteurs EP<sub>3</sub>. Le sous-type EP<sub>3</sub> peut être couplé à différents seconds messagers car il existe différentes isoformes chez les bovins (NAMBA *et al.*, 1993). L'isoforme EP<sub>3D</sub> peut être couplé à une protéine G<sub>s</sub> et augmenter la production d'AMPc. Cette isoforme n'est pas présente dans notre préparation car les agonistes EP<sub>3</sub>, soit le MB 28767 et le Sulprostone n'ont pas augmenté la production d'AMPc. Les chondrocytes bovins ne possèdent également pas une isoforme EP<sub>3</sub> couplée à une augmentation d'IP<sub>3</sub>, car aucune augmentation d'IP<sub>3</sub> n'a été observée après stimulation avec PGE<sub>2</sub>. Afin de vérifier la présence de récepteurs EP<sub>3</sub> couplés à l'inhibition de l'adénylate cyclase (SUGIMOTO *et al.*, 1992) nous avons incubé des cellules avec de la Forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase (HUANG *et al.*, 1982), et ajouté de la PGE<sub>2</sub> par la suite. Aucune inhibition de l'augmentation de l'AMPc intracellulaire induite par la Forskoline n'a été observée après l'addition de PGE<sub>2</sub>, ce qui suggère l'inexistence de récepteurs de sous-type EP<sub>3</sub> couplés à l'inhibition de l'adénylate cyclase. Il serait possible, cependant, que l'effet prédominant de la PGE<sub>2</sub> d'augmenter l'activité adénylate cyclase puisse masquer une plus faible quantité de récepteurs couplés à la même enzyme via une protéine G<sub>i</sub> et dont l'effet serait l'inhibition de l'adénylate cyclase. De tels récepteurs, si présents en faible quantité, pourraient ne pas être observables par l'essai de la Forskoline. Nous avons donc envisagé une autre approche, celle de stimuler les cellules à la PGE<sub>2</sub> en présence et en absence d'un inhibiteur des protéines G<sub>i</sub>. Notre raisonnement était que, si un récepteur couplé à l'adénylate cyclase par le biais d'une protéine G<sub>i</sub> était présent dans la préparation, la réponse à la PGE<sub>2</sub> en présence de l'inhibiteur de la protéine G<sub>i</sub> serait supérieure à celle obtenue en absence de l'inhibiteur. Comme inhibiteur de la protéine G<sub>i</sub> nous avons choisi la toxine pertussis (PTx), qui



catalyse l'ADP- ribosylation d'une cystéine sur la chaîne de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_i$ . Cette modification covalente laisse la protéine  $G_i$  dans la forme inactivé et empêche la transduction du signal (BURNS *et al.*, 1983). Nous avons observé que le traitement à la PTx n'augmente pas la réponse à la  $PGE_2$ . Comme témoin positif à la PTx nous avons utilisé un analogue de la somatostatine, le composé SMS 201-995 (PLESS *et al.*, 1986), puisque nos études préliminaires avec cette hormone ont montré la présence de récepteurs spécifiques dans notre système. Cette hormone est connue pour se lier à une série de récepteurs spécifiques dont au moins 5 sous-types sont connus (LAW *et al.*, 1995) et ils sont tous couplés à l'adénylate cyclase par une protéine  $G_i$  (VIOLLET *et al.*, 1995). Dans notre préparation, l'analogue de la somatostatine a diminué la réponse à la  $PGE_2$ , ce qui montre que l'activation d'un récepteur couplé à une protéine  $G_i$  pourrait interférer avec la réponse à la  $PGE_2$ . L'addition de PTx a diminué significativement l'effet de la somatostatine. Ces résultats montrent que la méthode pourrait détecter des récepteurs couplés à une protéine  $G_i$  et suggèrent l'absence de récepteurs à la  $PGE_2$  couplés à une protéine  $G_i$  dans notre préparation.

Afin de déterminer si le récepteur à la  $PGE_2$  présent dans les chondrocytes bovins en culture possèdent des activités biologiques nous avons étudié l'effet de la  $PGE_2$  sur un processus anabolique du cartilage, la production de glycosaminoglycans, et sur une activité catabolique, la production de métalloprotéases. Après stimulation avec  $PGE_2$  pendant une période de 24 heures, la libération de glycosaminoglycans dans le surnageant des chondrocytes bovins en culture n'a pas changé par rapport à des cellules non stimulées. À l'aide de ces résultats nous pouvons conclure que les prostaglandines n'ont pas d'effet sur la production et la libération de glycosaminoglycans dans le milieu. La stimulation des chondrocytes avec  $PGE_2$  a, cependant, augmenté la production des métalloprotéases. Cet effet est également observé avec le composé 11-deoxy- $PGE_1$ , un agoniste  $EP_2$  et  $EP_4$ . La production de métalloprotéases induit par la  $PGE_2$  a été inhibée par l'antagoniste  $EP_4$  AH 23 848B. L'agoniste  $EP_1$  17-Phenyl-trinor- $PGE_2$  et le

Sulprostone (agoniste  $EP_3/EP_1$ ) n'ont eu aucun effet significatif sur la production de métalloprotéases. La forskoline et l'IBMX, deux composés qui augmentent la concentrations intracellulaire d'AMPc ont eu un effet semblable à celui de la  $PGE_2$  sur la production de métalloprotéases. Ces résultats correspondent à ceux obtenus pour la production d'AMPc et démontrent que le récepteur à la  $PGE_2$  présent chez les chondrocytes bovins en culture agit par le voie de la stimulation de l'adénylate cyclase et qu'il est impliqué dans une action biologique importante.

Les résultats obtenus sur les chondrocytes bovins peuvent avoir des implications pharmacologiques et thérapeutiques importantes. Si les mêmes résultats sont obtenus chez l'humain cela pourrait avoir de grandes répercutions dans le traitement de l'arthrite et de l'ostéoarthrite. En bloquant l'action des prostaglandines au niveau du cartilage avec des antagonistes spécifiques, cela permet de conserver les effets physiologiques positifs des prostaglandines sur d'autres sous-types de récepteurs tel le  $EP_3$  qui se trouve principalement au niveau des reins et de l'estomac. Nous procédons actuellement à la caractérisation des récepteurs à la  $PGE_2$  dans des chondrocytes articulaires humains en culture suivant le protocole que nous avons utilisé dans la présente étude. Nous croyons que ces études pourront ouvrir une nouvelle avenue dans le traitement des maladies articulaires inflammatoires et dégénératives.



## CONCLUSION

À l'aide de cette étude nous avons montré que les chondrocytes bovins possèdent un seul récepteur à la  $\text{PGE}_2$  dont les caractéristiques biologiques sont semblables à celles des récepteurs  $\text{EP}_4$ . Nous ne pouvons pas conclure de façon définitive qu'il s'agisse d'un récepteur de sous-type  $\text{EP}_4$  puisque la nature de l'antagonisme par le composé AH 23 848B n'a pas pu être établie avec les outils pharmacologiques disponibles. Ce récepteur est lié à une protéine Gs et une action catabolique en augmentant la production de métalloprotéases suite à une stimulation avec la  $\text{PGE}_2$ . Nous avons aussi montré l'existence d'un récepteur du type IP couplé de façon positive à l'adénylate cyclase dont le rôle physiologique reste à démontrer.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le Dr Artur de Brum Fernandes, mon directeur de recherche pour sa disponibilité, ses conseils, son encouragement, son support financier et la confiance qu'il m'a accordé.

Je tiens à remercier les Drs Gaétan Guillemette et Gilles Dupuis pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Je remercie mes collègues de travail Maximilien Lora et Sophie Morisset pour leurs collaborations, leurs encouragements et pour l'atmosphère agréable de travail.

Je tiens également à remercier tout le service de rhumatologie pour l'esprit d'unité qui règne dans le département et qui rend la vie agréable.

Je remercie Sylvie Bernier pour m'avoir montré la technique de dosage des inositols triphosphate, le Dr. Ghassan Bkaily pour nous avoir permis de faire de la microscopie confocale et le Dr. Jean Morisset pour nous avoir donné le composé SMS-201 995.

Finalement, je remercie mon mari Stéphane Martin pour son support moral et sa patience ainsi que mes parents qui m'ont permis de me rendre jusqu'où je suis aujourd'hui.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABRAMOVITZ, M., BOIE, Y., NGUYEN, N., RUSHMORE, T.H., BAYNE, M.A.,  
METTERS, K.M., SLIPETZ, D.M. GRYGORCZYK, R., (1994) Cloning and  
expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor, *J. Biol. Chem.* 269:  
2632-2636
- ADAM, M., BOIE Y., RUSHMORE, T. H., MULLER, G., BASTIEN, L., MCKEE,  
K.T., METTERS, K. M., ABRAMOVITZ, M. (1994) Cloning and expression of  
three isoforms of the human EP3 prostanoid receptor. *Febs Letters* **338**: 170-174.
- AIKEN, J.W., SHEBUSKI, R.J., (1980) Comparaison in anesthetized dogs of the anti-  
aggregatory and hemodynamic effects of prostacyclin and a chemically stable  
prostacyclin analogue, 6a-carba-PGI<sub>2</sub> (Carbacyclin). *Prostaglandins* **19**, 629-643
- ARNER, E.D., PRATTA, M.A., (1989) Independent effects of interleukin-1 on  
proteoglycan breakdown, proteoglycan synthesis, and prostaglandin E<sub>2</sub> release from  
cartilage in organ culture. *Arthritis Rheum.* **32**:288- 297
- ATIK, O.S. (1990). Leukotriene B4 and prostaglandin E2-like activity in synovial fluid in  
osteoarthritis. *Prostaglandins Leukotrienes Ess. Fatty Acids* **39**:253-254



- AZZO, W., WOESSNER, J.F. (1986), Purification and characterization of an acid metalloproteinase from human articular cartilage. *J. Biol. Chem.* **261**:5434-5441
- BASTIEN, L., SAWYER, N., GRYGORCZYK, R., METTERS, K. M., ADAMS, M., (1994) Cloning, functional expression, and characterization of the human (1994) Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP2 subtype. *J. Biol. Chem.* **269**: 11873-11877
- BENNETT, A., ELEY, K. J., SCHOLE, G.B., (1968) Effects of prostaglandins E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> on human, guinea-pig and rat isolated small intestine. *Br. J. Pharmacol.* **34**: 630-638
- BENNETT, A., POSNER, J., (1971) Studies on prostaglandin antagonists, *Br. J. Pharmacol.* **42**, 584-594
- BERGSTRÖM, S., SJÖVALL, J. (1957) The isolation of prostaglandin. *Acta Chem. Scand.* **11**:1086
- BKAILY, G., (1994) The possible role of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels in VSM pathophysiology. In *Ionic Channels in Vascular Smooth Muscle*. Ed. Bkaily, G. pp 103-113 Georgetown, USA: R.G. Landes Co.

- BOCQUET, J., DAIREAUX, M., LANGRIS, M., JOUIS, V., PUJOL, J.-P., BELIARD, R., LOYAU, G. (1986) Effect of a interleukin-1 like factor (mononuclear cell factor) on proteoglycan synthesis in cultured human articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**:539-549
- BOIE, Y., RUSHMORE, T. H., DARMON-GOODWIN, A., GRYGORCZYK, R., SLIPETZ, D. M., METTERS, K. M., ABRAMOVITZ, M., (1994) Cloning and expression of cDNA for the human prostanoid IP receptor, *J. Biol. Chem.* **269**: 12173-12178
- BOIE, Y., SAWYER, N., R., SLIPETZ, D. M., METTERS, K. M., ABRAMOVITZ, M., (1995) Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor, *J. Biol. Chem.* **270**: 18910-18916
- BOULAY, G., GALLO-PAYET, N., GUILLEMETTE, G., (1990). Implication of phospholipase C in the steroidogenic action of angiotensin II. *Eur. J. Pharmacol.* **189**, 267-275
- BREYER, R.D., ENESON, R.B., TARNG, J.-L., BREYER, M.D., DAVID L.S.; ABROMSON R.M.; FERRENBACH S.M. (1994) Alternative splicing generates multiple isoforms of a rabbit prostaglandin E2 receptor. *J. Biol. Chem.* **269**: 6163-6169.

- BUNCE, K.T., CLAYTON, N. M., COLEMAN, R. A., COLLINGTON, E. W., FINCH, H., HUMPHRAY, J.M., HUMPHREY, P.P.A., REEVES, J. J., SHELDRIK, R. L. G., STABLES, R.(1990) GR63799-a novel prostanoid with secectivity for EP3 receptors. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* **21**: 379-382.
- BUNCE, K.T., CLAYTON, N. M., KNIGHT, M., SHEPPARD, D. N., SPRAGGS, C. F., (1987) Differential effects of prostaglandins on unidirectional absorption and secretion in rat ileum. *Gastroenterology* **92**: 1332
- BUNNING, R.A.D., RUSSELL, R.G.G. (1989) The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **32**:780-784,
- BURNS, D.L., HEWLETT, E.L., MOSS, J., VAUGHAN, M., (1983) Pertussis toxin inhibits enkephalin stimulation of GTPase of NG108-15 cells. *J. Biol. Chem.* **258**: 1435-1438
- CAMPBELL, I.K., PICOLLI, D.S., HAMILTON, J.A., (1990) Stimulation of human chondrocyte prostaglandin E<sub>2</sub> production by recombinant human interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Biochim. Biophys. Acta.* **1051**:319-318

CAMRAS, C.B., SCHUMER, R.A., MARSK, A., LUSTGARTEN, J.S., SERLE, J.B., STJERNSCHANTZ, J., BITO, L.Z., PODOS, S.M. (1992). Intraocular pressure reduction with PhXA34, a new prostaglandin analogue in patients with ocular hypertension. *Arch. Ophthalmol.* **110**:1733-1738

CAMRAS, C. B., SHIEBOLD, E.C., LUSTGARTEN, J.S., SERLE, J.B., FRISCH, S.C., PODOS, S.M., BITO, L.Z., (1989) Maintained reduction of intraocular pressure by prostaglandin F<sub>2α</sub>-1-isopropyl ester applied in multiple doses in ocular hypertensive and glaucoma patients. *Ophthalmology.* **96**: 1329-1337

CHAVIRA, JR., R., BURNETT, T.J., HAGEMAN, J.H., (1984) Assaying proteinases with Azocoll. *Anal. Biochem.* **136**: 446-450

CHEN, M. C. Y., AMIRIAN, D. A., TOOMEY, M., SANDERS, M. J. SOLL, A. H.(1988) Prostanoid inhibition of canine parietal cells : mediation by the inhibitory guanosine triphosphate-binding protein of adenylate cyclase. *Gastroenterology* **94**: 1121-1129

CHIN, J.E., LIN, Y. (1988) Effects of recombinant human interleukin-1beta on rabbit articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **31**:1290-1296

- COLEMAN, R.A., (1987a) Methods in prostaglandin receptor classification. In  
 prostaglandins and related substances- A practical approach, edited by C. Benedetto,  
 R.G. McDonald-Gibson, S. Nigam, T.F. Slater, pp. 267-303, IRL Press Oxford, UK
- COLEMAN, R.A., DENYER, L.H., SHELDRIK, R.L.G. (1985a) The influence of  
 protein binding on the potency of the prostanoid EP 1-receptor blocking drug.  
 AH6809. Br. J. Pharmacol. **86**: 203P
- COLEMAN, R. A., GRIX, S. P., HEAD, S. A., LOUTTIT, J. B., MALLETT, A.,  
 SHELDRIK, R. L. G., (1994a) A novel inhibitory receptor in piglet saphenous  
 vein. Prostaglandins **47**: 151-168
- COLEMAN, R.A., KENNEDY, I., LEVY, G.P., (1979) SC-19220, a selective prostanoid  
 SHELDRIK, R. L. G., (1994a) A novel inhibitory receptor in piglet saphenous  
 vein. Prostaglandins **47**: 151-168
- COLEMAN, R.A., KENNEDY, I., LEVY, G.P., (1979) SC-19220, a selective prostanoid  
 receptor antagonist. Br. J. Pharmacol. **69**: 266P
- COLEMAN, R.A., KENNEDY, I., SHELDRIK R.L.G., TOLOWINSKA, I.Y. (1987b)  
 Further evidence for the existence of three subtypes of pge<sub>2</sub>- sensitive (ep-)  
 receptors. Br. J. Pharmacol. **91**; : 407P.
- COLEMAN, R.A., KENNEDY, I., SHELDRIK, R.L.G., (1985b) AH6809, A



- COLEMAN, R.A., KENNEDY, I., SHELDRIK, R.L.G., (1987c) Evidence for the existence of three subtypes of PGE<sub>2</sub> sensitive (EP) receptors in smooth muscle. Br. J. Pharmacol. **91**: 323P
- COLEMAN, R.A., KENNEDY, I., HUMPHREY, P. P. A., BUNCE, K., LUMLEY, P. (1990) Prostanoids and their receptors. In Comprehensive Medicinal Chemistry Vol. 3, Membranes and Receptors, edited by J.C. EMmett, pp. 643-714, Pergamon Press, Oxford, UK.
- COLEMAN, R.A., KENNEDY, I. (1985c) Characterisation of the prostanoid receptors mediating contraction of guinea-pig isolated trachea. Prostaglandins **29**: 363-375
- COLEMAN, R.A., HUMPHRAY, R.L.G., SHELDRIK, R.L., WHITE, B.P., (1988) Gastric antiseecretory prostanoids : Actions at different prostanoid receptors. Br. J. Pharmacol. **95**: 724P
- COLEMAN, R., SMITH, W.L., NARUMIYA, S., (1994b). VIII. International Union of Pharmacology Classification of Prostanoid Receptors: Properties, distribution, and structure of the receptor and their subtypes.. Pharmacol. Rev. **46**:205-229

- CREESE, B. R., DENBOROUGH, M. A., (1981) The effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on contractility and cyclic AMP levels of guinea-pig tracheal smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **8**: 616-617
- CSUKAS, S., BHATTACHERJEE, P., RHODES, L., PATERSON, C.A. (1992) Prostaglandin-E<sub>2</sub> binding site distribution and subtype classification in the rabbit iris-ciliary body. *Prostaglandins* **44**:199-208, .
- DAYER, J.M., ROBINSON, D.R., KRANE, S.M. (1977) Prostaglandin production by rheumatoid synovial cells. *J. Exp. Med.* **145**: 1399-1404
- DEAN, D.D., AZZO, W., MARTEL-PELLETIER, J., PELLETIER J.-P., WOESSNER J.F., (1987) Levels of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human osteoarthritic cartilage. *J.Rheumatol.* **14(suppl.)**: 43-44
- DEAN, D.D., MARTEL-PELLETIER, J., PELLETIER J.-P., HOWELL, D.S., WOESSNER J.F., (1989) Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J.Clin. Invest.* **84**: 678-685
- DEAN, D.D., WOESSNER J.F., (1984) Extracts of human articular cartilage contain an inhibitor of tissue metalloproteinases, *Biochem. J.* **218**:277-280

- DE BRUM-FERNANDES, A. J., LAPORTE, S., HEROUX, M., LORA, M., PATRY, C.,  
MÉNARD, H. A., DUMAIS, R., LEDUC, R. (1994) Expression of prostaglandin  
endoperoxidase synthase-1 and prostaglandin endoperoxidase synthase-2 in human  
osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**: 955-960
- DE VRIES, G.W., GUARINO, P., MCLAUGHLIN, A., CHEN, J., ANDRWES, S. &  
WOODWARD, D.F. (1995). An EP receptor with a novel pharmacological profile  
in the T-cell line Jurkat. *Br. J. Pharmacol.* **115**, 1231-1234
- DEWITT, D. L., DAY, J.S., SONNENBURG, W. K., SMITH, W. L., (1983)  
Concentrations of prostaglandin I<sub>2</sub> synthase in the endothelium and smooth muscle  
of bovine aorta. *J. Clin. Invest.* **72**: 1882-1888.
- DONG, Y.J., JONES, R.L., WILSON, N.H., (1986) Prostaglandin E receptor subtypes in  
smooth muscle: agonist activities of stable prostacyclin analogues. *Br. J.*  
*Pharmacol.* **87**: 97-107.
- DOWNES, C. P., HAWKINS, P. T., IRVINE R. F., (1986) Inositol 1,3,4,5-  
tetrakisphosphate and not phosphatidylinositol 3,4-biphosphate is the probable  
precursor of inositol 1,3,4-triphosphate in agoniste-stimulated parotid gland.  
*Biochem. J.* **238**: 510-506

- EDET, S., JAMBLATT, J. E., (1990) Prejunctional inhibitory effects of prostanoids on sympathetic neurotransmission in the rabbit iris-ciliary body. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**: 11-16
- EGLIN, R. M., WHITING, R. L., (1988) The action of prostanoid receptor agonists and antagonists on smooth muscle and platelets. *Br. J. Pharmacol.* **94**: 591-601
- EHRENPREIS, S., GREENBERG, J., BELMAN, S., (1973) Prostaglandins reverse inhibition of electrically contraction of guinea-pig ileum by morphine and acetylsalicylic acid. *Nature* **245**: 280-282
- FARNDAL, R. W., SAYERS, C. A., BARRETT, A. J., (1982) A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect. Tissue Res.* **9**:247-248
- FUNK, C. D., FURCI, L., FITZGERALD, G. A., GRUGORCZYK, R., ROCHETTE, C., BAYNE, M. A., ABRAMOVITZ, M., ADAM, M., METTERS, K. M., (1993) Cloning and Expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J. Biol. Chem.* **268**: 26767-26772.



- FUNK, C.D., FUNK, L. B., KENNEDY, M. E., PONG, A. S., FITZGERALD, G. A.,  
(1991) Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA  
cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* **5**: 2304-2312
- GARDINER, P.J., (1986) Characterization of prostanoid relaxant/ inhibitory receptors  
using a highly selective agonist, TR4979. *Br. J. Pharmacol.* **87**: 45-56.
- GILMAN, S.C., (1987) Activation of rabbit articular chondrocytes by recombinant  
human cytokines. *J. Rheumatol.* **14**:1002-1007
- GOLDRING, M.B., BIRKHEAD, J., SANDELL, L.J., KRANE, S.M., (1990) Synergistic  
regulation of collagen gene expression in human chondrocytes by tumor necrosis  
factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ . *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **580**:536-539
- GRANTHAM, J. J., ORLOFF. J., (1968) Effect of prostaglandin E<sub>1</sub> on the permeability  
response of the isolated collecting tubule to vasopressin, adenosine 3',5'-  
Monophosphate, and theophylline. *J. Clin. Invest.* **47**: 1154-1161
- GUSOVSKY, F., (1991) Prostaglandin Receptors in NIH 3T3 cells: coupling of one  
receptor to adenylate cyclase and of a second receptor to phospholipase C.  
*Pharmacol. Exp. Ther.* **40**: 633-638

- HARRIS, E. J., (1990) Rheumatoid arthritis : pathophysiology and implication for therapy. *New. Engl. J. Med.* **322**:1277-1289
- HAUSDORFF, W. P., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J., (1990), Turning off the signal desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J.* **4**: 2881-2889
- HARDCASTLE, J., HARDCASTLE, P. T., REDFERN, J. S., (1982) Morphine has no direct effect on PGE<sub>2</sub>-stimulated cyclic AMP production by rat isolated enterocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* **34**: 68
- HEDGVIST, P., VON, E., (1972) Prostaglandin-induced neurotransmission failure in the field stimulated, isolated vas deferens. *Neuropharmacology* **11**: 177-187
- HERSHMAN, H.R., (1992) Characterization of a gene encoding a second prostaglandin synthase/cyclooxygenase (PGS/COX), whose message and protein are induced by mitogens and inhibited by glucocorticoids. The 8th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds Montreal, Abstr. No. **302**.
- HIRATA, M., HAYASHI, Y., USHIKUBI, F., YOKOTA, Y., KAGEYAMA, R., NAKANISHI, S., NARUMIYA, S., (1991) Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature* **349**: 617-620

- HLA, T., NEILSON, K., (1992) Human cyclooxygenase-2 cDNA, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**: 7384-7388
- HONDA, A., SUGIMOTO, Y., NAMBA, T., WATABE, A., IRIE, A., NEGISHI, M., NARUMIYA, S., ICHIKAWA, A., (1993) Cloning and Expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. J. Biol. Chem. **268**: 7759-7762.
- HOULD, R. (1982) Histologie descriptive et éléments d'histopathologie, Décarie, Montréal, pp.58-68
- HUANG, R-D., SMITH, M. F., ZAHLER, W. L., (1982) Inhibition of forskolin-activated adenylate cyclase by ethanol and other solvents. J. Cyclic Nucleotide Research. **8**:385-394
- IKEBE, T., HIRATA, M., KOGA, T., (1988) Effects of human recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 1 on the synthesis of glycosaminoglycan and DNA in cultured rat costal chondrocytes. J. Immunol. **140**:827-831
- IKEBE, T., HIRATA, M., KOGA, T., (1986) Human recombinant interleukin-1 mediated suppression of glycosaminoglycan synthesis in cultured rat costal chondrocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. **140**:386-391

- IRIE, A., SUGIMOTO, Y., NAMBA, T., HARAZONO, A., HONDA, A., WATABE, A.,  
NEGISHI, M., NARUMIYA, S., ICHIKAWA, A., ( 1993) Third isoform of the  
prostaglandin-E-receptor EP3 subtype with different C- terminal tail coupling to  
both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur. J. Biochem.* **217**: 313-  
318.
- KATZUNG, B.G., (1989) *Basic and Clinical Pharmacology*, Appleton & Lange,  
California, pp.228-241
- KELLEY, W.N., HARRIS, E.D., RUDDY, S., SLEDGE, C.B., (1993) *Textbook of  
Rheumatology*, W.B. Saunders Compagny, Philadelphia p.1-265, 1374
- KENAKIN, T.P. (1987) Drug antagonism. *Pharmacologic analysis of drug-receptor  
interaction*. Raven Press, pp. 205-244, New York.
- KENNEDY, I., COLEMAN, R.A., HUMPHREY, P.P.A., LEVY, G.P., LUMLEY, P.,  
(1982) Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed  
classification. *Prostaglandins* **24**: 667-689.
- KENNEDY, T.G., KEYS, J.L., KING, G.J., (1986) Endometrial prostaglandin E<sub>2</sub>-binding  
sites in the pig: characterization and changes during the estrous cycle and early  
pregnancy. *Biol. Reproduct.* **35**:624-632



KRALL, J. F., BARRETT, J. D., JAMGOTCHIAN, N. J., KORENMAN, S.G., (1984)

Interaction of prostaglandin E<sub>2</sub> and  $\beta$ -adrenergic catecholamine in the regulation of uterine smooth muscle motility and adenylate cyclase in the rat. *J.Endocrinol.* **102**: 329-336

KUJUBU, D. A., FLETCHER, B. S., VARNUM, B. C., LIM, R. W., HERSCHMAN, H.

R., (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inductible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.* **266**: 12866-12872

KURZROK, R., LIEB, C.C. (1930) Biochemical studies of human semen. II. The action of semen on the human uterus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **28**: 268-272

LAEKMAN, G.M., HERMAN, A.G., (1979) Indomethacin increases the production of SRS-A by the ileum from sensitized guinea-pigs. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **242**:307-309,

LAW, S.F., WOULFE, D. & REISINE, T., (1995) Somatostatin receptor activation of cellular effector systems. *Cell. Signalling* **7**, 1-8.

- LAWRENCE, R.A., JONES, R.L., (1992a) Investigation of the prostaglandin E (EP-) receptor subtype mediating relaxation of the rabbit jugular vein. *Br. J. Pharmacol.* **105**: 817-824.
- LAWRENCE, R., JONES, R.L., WILSON, N.H., (1992b) Characterization of receptors involved in the direct and indirect actions of prostaglandins E and I on the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* **105**: 271-278.
- LEONG, W.S., RUSSELL, R.G.G., CASWELL, A.M., (1993) Induction of enhanced responsiveness of human articular chondrocytes to extracellular ATP by tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Clin. Sci.* **85**:569-575
- MALEMUD, C., MOSKOWITZ, R.W., HASSID, A., (1981) Prostaglandins biosynthesis by lapine articular chondrocytes in culture. *Biochim. Biophys. Acta* **663**: 180-190
- MALEMUD, C., SOLILOFF, L. (1977) The effect of prostaglandins on cultured lapine articular chondrocytes. *Prostaglandins* **13**:845-859
- MALMSTEN, C., (1976) Some biological effects on prostaglandin analogs. *Life Sci.* **18**:169-176

- MAROUDAS, A., MIZRAHI, J., KATZ, E.P., WACHTEL, E.J., SOUDRY M., (1986)  
Physiochemical properties and functional behaviour of normal and osteoarthritic  
human cartilage, in Articular Cartilage Biochemistry. Kuettner, K., Schleyerbach,  
R., and Hascall, V.C., Eds., Raven Press, New York, 311-330
- MARTEL-PELLETIER, J., PELLETIER, J.-P., CLOUTIER, J.M., HOWELL, D.S.,  
GHANDUR-MNAYMNEH, L., WOESSNER, J.F., (1984) Neutral proteases  
capable of proteoglycan digesting activity in osteoarthritis and normal human  
articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **27**: 305-312
- MCCARTY, D.J., KOOPMAN, W.J., *Arthritis and allied conditions*, Lea Febiger,  
Pennsylvanie, (1993) p. 279-489
- MCKENNIFF, M., RODGER, I. W., NORMAN P., GARDINER, P. J. (1988)  
Characterisation of receptors mediating contractile effects of prostanoid in guinea-  
pig and human airways. *Eur. J. Pharmacol.* **153**: 149-159
- MENÉ, P., DUYAK, G.R., SCARPA, A., DUNN, M.J. (1987) Stimulation of cytosolic  
free calcium and inositol phosphates by prostaglandins in rat glomerular mesangial  
cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**: 579-586

- MITCHELL, M.D., SILVER, R.M., CARLTON, D., JONES, D., PRESCOTT, S.,  
SMOTKIN, D., EDWIN, S., TRAUTMAN, M.S., (1992). An interleukin-1-beta-  
inducible cyclooxygenase in human amnion. The 8th International Conference on  
Prostaglandins and Related Compounds. Montreal, Abstr. No. 299.
- MOLNAR, M., HERTELENDY, F., (1990)  $\text{PGF}_{2\alpha}$  and  $\text{PGE}_2$  binding to rat myometrium  
during gestation, parturition, and postpartum. Am. J. Physiol. **259**: E872-E880
- MONICK, M., GLASIER, J., HUNNIGHAKE, G. W., (1987) Human alveolar  
macrophages suppress interleukin-1 (IL-1) activity via the secretion of  
prostaglandin  $\text{E}_2$  Am. Rev. Respir. Dis. **135**: 72-77
- NAKAO, A., ALLEN, M.L., SONNENBURG, W. K., SMITH, W. L., (1989) Regulation  
of cAMP metabolism by  $\text{PGE}_2$  in cortical and medullary thick ascending limb of  
Henle's loop. Am. J. Physiol. **256**: C652-C657
- NAKAO, A., WATANABE, T., TANIGUCHI, S., NAKAMURA, M., HONDA, Z.,  
SHIMIZU, T., KUROKAWA, K., (1993) Characterization of prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$   
receptor of Mouse 3T3 fibroblast and its functional expression in *Xenopus Laevis*  
oocytes. J. Cell. Physiol. **155**:257-264



- NAMBA, T., OIDA, H., SUGIMOTO, Y., KAKIZUKA, A., NEGISHI, M., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S., (1994) cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor, *J. Biol. Chem.* **269**: 9986-9992
- NAMBA, T., SUGIMOTO, Y., NEGISHI, M., IRIE, A., USHIKUBI, F., KAKIZUKA, A., ITO, S., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S., (1993) Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature* **365**: 166-170
- NAMBA, T., SUGIMOTO, Y., HIRATA, M., HAYAISHI, Y., HONDA, A., WATABE, A., NEGISHI, M., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S., (1992) Mouse thromboxane A<sub>2</sub> receptor cDNA cloning, expression and northern blot analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**:1197-1203
- NEGISHI, M., ITO, S., HAYAISHI, O., (1989) Prostaglandin E receptors in bovine adrenal medulla are coupled to adenylate cyclase via G<sub>i</sub> and to phosphoinositide metabolism in a pertussis toxin-insensitive manner. *J. Biol. Chem.* **264**: 3916-3923
- NEGISHI, M., ITO, S., HAYAISHI, O., (1990) Involvement of protein kinase C in prostaglandin E<sub>2</sub>-induced catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 6183-6188

- NISHIGAKI, N., NEGISHI, M., HONDA, A., SUGIMOTO, Y., NAMBA, T., NARUMIYA, S., ICHIKAWA, A., (1995) Identification of prostaglandin E receptor 'EP2' cloned from mastocytoma cells as EP4 subtype. *FEBS Letters* **324**: 339-341
- O'BANION, M.K., SADOWSLI, H.B., WINN, V., YOUNG, D.A., (1991) A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J. Biol. Chem.* **266**:23261-23267.
- O'BANION, M.K., WINN, V.D., YOUNG, D.A., (1992). *grIPGHS*: A second cyclooxygenase gene responsive to glucocorticoids, growth factors, and cytokines. The 8th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds. Montreal, Abstr. No. **303**.
- OKUDA-ASHITAKA, E., SAKAMOTO, K., GILES, H., ITO, S., HAYAISHI, O., (1993) Cyclic-AMP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx elicited by prostaglandin D2 in freshly isolated nonchromaffin cells from bovine adrenal medulla. *Biochim. Biophys. Acta.* **1176**: 148-154
- OLIVA, D., AND NICOSIA, S., (1987)  $\text{PGI}_2$ -receptors and molecular mechanisms in platelets and vasculature: state of the art. *Pharmacol. Res. Commun.* **19**:735-765

- O'SULLIVAN, M. G., HUGGINS, E. M. MEADE, E. A., DEWITT, D. L. MCCALL, C. E., (1992) Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoid involved induction of novel prostaglandin H synthase. *J. Biol. Chem.* **267**: 14547-14550
- PATRY, C., MÜLLER, E., LAPORTE, J., ROLA-PLESZCZYNSKI, M., SIROIS, P., DE BRUM-FERNANDES, A.J., (1996) Development of leukotriene B4 and leukotriene D4 receptors in HL-60 cells differentiated into eosinophils, monocytes and neutrophils. *J.Pharmacol. Exp. Ther. in Press.*
- PELLETIER, J.-P., MARTEL-PELLETIER, J., (1989) Evidence for the involvement of interleukin 1 in human osteoarthritis cartilage degradation: protective effect of NSAID. *J. Rheumatol.* **16**:19-27.
- PELLETIER, J.-P, MARTEL-PELLETIER, J., CLOUTIER, J.M., WOESSNER J. (1987), Proteoglycan-degrading acid metalloproteinase activity in human osteoarthritic cartilage and the effect of intraarticular steroid injections. *Arthritis Rheum.* **30**:541-548
- PELLETIER, J.-P, MARTEL-PELLETIER, J., HOWEL, D. S., GHANDUR-MNAYMNEH, L., ENIS, J. E., WOESSNER J. F., (1983a), Collagenase and collagenolytic activity in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* **26**:63-68

- PELLETIER, J.-P, MARTEL-PELLETIER, J., HOWEL, D. S., GHANDUR-MNAYMNEH, L., ENIS, J. E., WOESSNER J. F., (1983b), Collagenolytic activity and collagen matrix breakdown of the articular cartilage in Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **26**: 866-874
- PIERCE, K.L., GIL, D.W., WOODWARD, D.F., REGAN, J.W., (1995) Cloning of human prostanoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**:253-256
- PLESS, J., BAUER, W., BRINER, U., DOEPFNER, W., MARBACH, P., MAURER, R., PETCHER, T.J., REUBI, J.-C. & VONDERSCHER, J. (1986). Chemistry and pharmacology of SMS 201-995, a long-acting octapeptide analogue of somatostatin. *Scand. J. Gastroentrol.* **21**, 54-64.
- REEVES, J. J., BUNCE, K. T., HGELDRICK, R. L. G., STABLES, R., (1988) Evidence for the PGE receptor subtype mediating inhibition of acid secretion in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **95**, 805P.
- REGAN, J.W., BAILEY, T.J., PEPPERL, D.J., PIERCE, K.L., BOGARDUS, A.M., DONELLO, J. E., FAIRBAIRN, C.E., KEDZIE, K.M., GIL, D.W., (1994) Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP<sub>2</sub> subtype. *Molecular Pharmacol.* **46**: 213-220



- RICHELSEN, B., BECK-NIELSEN, H., (1984) Decrease of prostaglandin E<sub>2</sub> receptor binding is accompanied by reduced antilipolytic effects of prostaglandins E<sub>2</sub> in isolated rat adipocytes. *J. Lipid Res.* **26**: 127-134
- ROBINSON, D.R., SKOSKIEWICZ, M., BLOCH, K.J., CASTORENA, G., HAYES, E., LOWENSTEIN, E., MELVIN, C., MICHELASSI, F., ZAPOL, W.M., (1986) Cyclooxygenase blockade elevates LTE<sub>4</sub> production during acute anaphylaxis in sheep. *J. Exp. Med.* **163**:1509-1517,
- SAKLATVALA, J., (1986) Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* **322**: 547-549
- SANDO, T., USUI, T., TANAKA, I., MORI, K., SASAKI, Y., FUKUDA, Y., NAMBA, T., SUGIMOTO, Y., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S., NAKAO, K., (1994) Molecular cloning and expression of rat prostaglandin E receptor EP2 subtype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**:1329-1333
- SANNER J.H., (1969) Antagonism of prostaglandin E<sub>2</sub> by 1-acetyl-2-(8-chloro-10,11-dihydrodibenz [b,f ] [1,4 ] oxazepine-10-carbonyl) hydrazine (SC-19220), *Arch. Int. Pharmacodyn.* **180**: 46-56

SAVARES, T.M., FRASER, C. M., (1992) In vitro mutagenesis and the search for structure function relationship among G protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **283**: 1-19

SENIOR, J., MARSHALL, K., SANGHA, R., BAXTER, G.S., CLAYTON, J.K., (1991)  
*In vitro* characterization of prostanoid EP-receptors in the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.* **102**: 747-753

SENIOR, J., SANCHI, R., BAXTER, G.S., MARSHALL, K., CLAYTON, J.K., (1992)  
*In vitro* characterization of prostanoid FP-, DP-, IP-, and TP-receptors in the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.* **107**:215-221, .

SHELDRIK, R.L.G., COLEMAN, R.A., LUMLEY P., (1988) Iloprost-A potent EP1 and IP-receptor agonist. *Br. J. Pharmacol.* 334P

SIEGL, A.M., SMITH, J.B., SILVER, M.J., NICOLAOU, K.C., AHERN, D., (1979)  
Selective binding site for [<sup>3</sup>H]-prostacyclin on platelets. *J. Clin. Invest.* **63**:215-220

- SMITT, W. L., BELL, T. G., (1978) Immunohistochemical localization of the prostaglandin forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am. J. Physiol.* **235**: F451-F457
- SONGZHU, A., YANG, J., XIA, M., GOETZL, E.J., (1993) Cloning and expression of the EP2 subtype of human receptors for prostaglandin E2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**: 263-270.
- SONNENBURG, W.K., SMITH W.L., (1988) Regulation of cyclic AMP metabolism in rabbit cortical collecting tubule cells by prostaglandins. *J. Biol. Chem.* **263**: 6155-6160.
- SONNENBURG, W.K., ZHU, J., SMITH, W.L., (1990) A prostaglandin E receptor coupled to a pertussis toxin sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit cortical collecting tubule cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 8479-8483
- STRONG, P., COLEMAN, R.A., HUMPHREY, P.P.A., (1992) Prostanoid-induced inhibition of lipolysis in rat isolated adipocytes: probable involvement of EP3 receptors. *Prostaglandins* **43**: 559-566
- SUGIMOTO, Y., HASUMOTO, K., NAMBA, T., IRIE, A., KATSUYAMA, M., NEGISHI, M., KAKIZUKA, A., NARUMIYA, S., ICHIKAWA, A., (1994a)

Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *J. Biol. Chem.* **269**:1356-1360

SUGIMOTO, Y., NAMBA, T., HONDA, A., HAYASHI, Y., NEGISHI, M., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S., (1992) Cloning and Expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J. Biol. Chem.* **267**: 6463-6466.

SUGIMOTO, Y., NAMBA, T., SHIGEMOTO, R., NEGISHI, M., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S., (1994b) Distinct cellular localization of the mRNAs for three sybtypes of prostaglandin E receptor in kidney. *Am. J. Physiol.* **266**: F823-828

SUGIMOTO, Y., NEGISHI, M., HAYASHI, Y., NAMBA, T., HONDA, A., WATABE, A., HIRATA, M., NARUMIYA, S., ICHIKAWA, A., (1993) Two isoforms of the EP3 receptor with different carboxyl-terminal domains, *J. Biol. Chem.* **268**: 2712-2718

SUGIMOTO, Y., SHIGEMOTO, R., NAMBA, T., , NEGISHI, M., MISUNO, N., NARUMIYA, S., ICHIKAWA, A., (1994c) Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP3 in the mouse nervous system. *Neurosci.* **62**: 919-928



- TANAKA, T., YOKOHAMA, H., NEGISHI, M., HAYASHI, H., ITO, S., HAYAISHI, O., (1990) Synergistic effect of prostaglandin E<sub>2</sub> and ouabain on catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* **54**: 86-95
- VANE, J., (1992) Evidence for the pro-inflammatory effect of prostaglandins. The 8th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds. Montreal, Abstr. No. **161**.
- VIGNON, E., MATHIEU, P., LOUISOT, P., VILAMITJANA, J., HARMAND, M.F., RICHARD, M., (1989) Phospholipase A2 activity in human osteoarthritic cartilage. *J. Rheumatol.* **16**:35-38.
- VINCENTI, M.P., CLARK, I. M., BRINCKERHOFF, C.E., (1994) Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis: easier said than done ? *Arthritis Rheu.* **37**: 1115-26
- VIOLET, C., PREVOT, G., MAUBERT, E., FAIVRE-BAUMAN, A., GARDETTE, R., KORDON, C., LOUDES, C., SLAMA, A., EPELBAUM, J., (1995) Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Fund. Clin. Pharmacol.* **9**:107-113

- WATABE, A., SUGIMOTO, Y., HONDA, A., IRIE, A. NAMBA, T. NEGISHI, M., ITO, S., NARUMIYA, S., ICHIKAWA, A., (1993) Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J. Biol. Chem.* **268**: 20175-20178
- WATANABE, T., SHIMIZU, T., NAKAO, A., TANIGUCHI, S., ARATA, Y., TERAMOTO, T., SEYAMA, Y., UI, M., KUROKAWA, K., (1991) Characterization of partially purified prostaglandin E2 receptor from the canine renal medulla: evidence for physical association of the receptor protein with the inhibitory guanine nucleotide-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1074**: 398-405.
- WATANABE, T., UMEGAKI, K., SMITH, W., (1986) Association of a solubilized prostaglandin E2 seceptor from renal sedulla with a pertusis toxin-reactive guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **262**: 13430-13439.
- WERB, Z., ALEXANDER, C.M., (1989) Proteases and matrix degradation, *Textbook of Rheumatology*. thrid edition. Edited by WN Kelley, ED Harris Jr., S. Ruddy, CB Sledge. Philadelphia : WB Saunders,. 248-265
- WHITTLE, B.J.R., MONCADA, S., WHITING, F. & VANE, J.R. (1980). Carbacyclin-a potent stable prostacyclin analogue for the inhibition of platelet aggregation. *Prostaglandins* **19**, 605-627

- WOODWARD, D.F., BURKE, J.A., WILLIAMS, L.S., PALMER, B.P. WHEELER, L.A.,  
WOLDEMUSSIE, E., RUIZ, G., CHEN, J. (1989) Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  effects on  
intraocular pressure negatively correlate with FP-receptor stimulation. Invest.  
Ophthalmol. Vis. Sci. **30**: 1838-1842
- XIE, W., CHIPMAN, J.G., ROBERTSON, D. L., ERIKSON, R.L. SIMMONS, D.  
L.,(1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase  
is regulated by mRNA splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**: 2692-2696
- YANG, J., XIA, M., GOETXL, E.J.; AN, S., (1994) Cloning and expression of the EP3-  
subtype of human receptors for prostaglandin  $E_2$ . Biochem. Biophys. Res.  
Commun. **198**: 999-1006.
- YOKOHAMA. H., TANAKA, T., ITO, S., NEGISHI, M., HAYASHI, H., HAYAISHI O.,  
(1988) Prostaglandin E receptor enhancement of catecholamine release may be  
mediated by phosphoinositide metabolism in bovine adrenal chromaffin cells.  
J.Biol. Chem. 263: 1119-1122